Técnicas de marcación y análisis

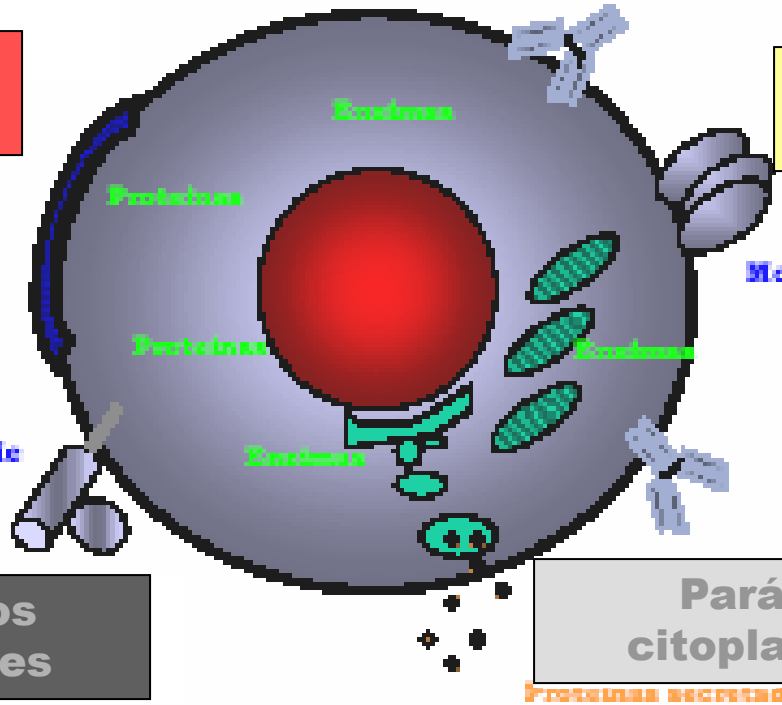
Bioq. Andrea Novoa

Citometría de flujo (CF)

Es una técnica **multiparamétrica** que permite estudiar propiedades físicas y biológicas de las células en una **suspensión fluida**.

El citómetro es un aparato capaz de medir varios *parámetros celulares* a partir de una *suspensión celular* por medio de la interacción de un haz de luz láser con las células guiadas mediante un flujo contínuo.

Parámetros celulares que pueden estudiarse



Contenido de ADN

Parámetros nucleares

Tamaño

Complejidad citoplasmática

Parámetros estructurales

Proteinas intracelulares

Actividad enzimática

Parámetros citoplasmáticos

Parámetros superficiales

Proteinas de superficie

Parámetros extracelulares

Proteinas secretadas

Interacción con otras cél.

Muestras: *Consideraciones en la manipulación*

- Recolección
- Protección (anticoag, medio de transporte)
- Transporte al lab.
- Manipulación en el lab.
- Tinción
- Análisis en el citómetro
- Técnicas y especificaciones
- Tonicidad, pH, nutrientes
- Tiempo y temperatura
- Diseño del protocolo
- Cc celular, lisis
- Buenos protocolos del instrumento

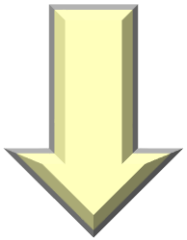
Tipos de muestra

- Sangre periférica (SP)
- Médula ósea (MO)
- Líquidos de punción: LCR, líquido pleural
- Tejidos linfoides: ganglio, bazo, timo
- Tumores sólidos
- Piel
- Biopsias de mucosas
- Células en cultivo
- etc…

Células en suspensión

Requisitos de la suspensión celular

- Representativa del tejido.
- Alta calidad con pocos agregados, debris y células muertas.
- Preservar los antígenos en su estado original.
- Suficiente cantidad de células para el estudio.
- Máximo rendimiento / mínima pérdida celular.
- Mantener la esterilidad, si es necesario.

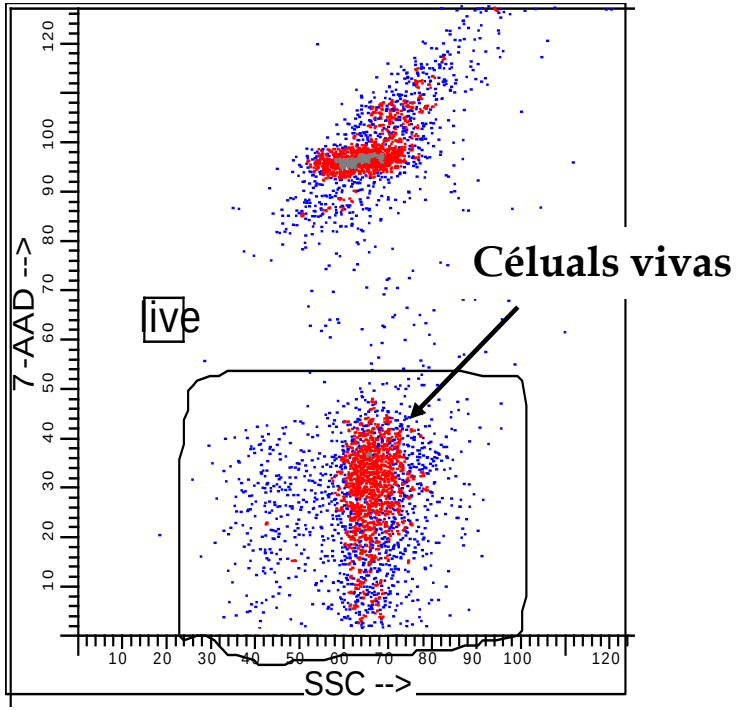


Mínima manipulación

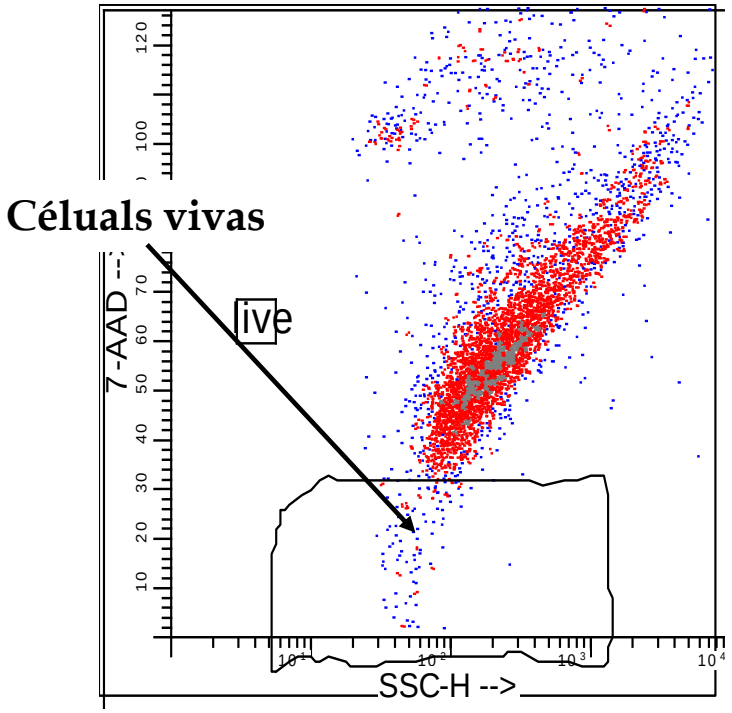
Integridad celular

Se define como la composición de todos los parámetros que afectan la presentación de antígenos a los anticuerpos reactivos y el mantenimiento del tamaño y forma celular.

Viabilidad con 7-AAD

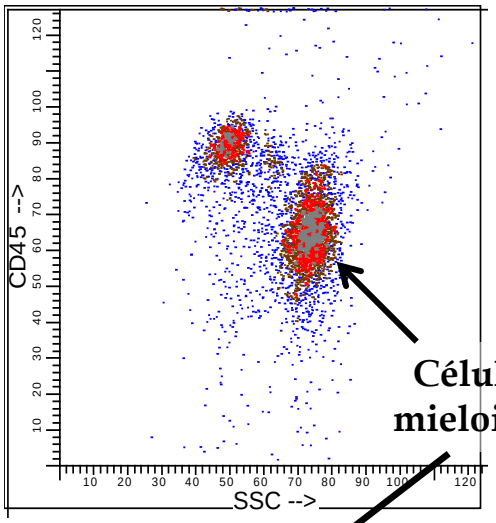


Buena viabilidad (75%)

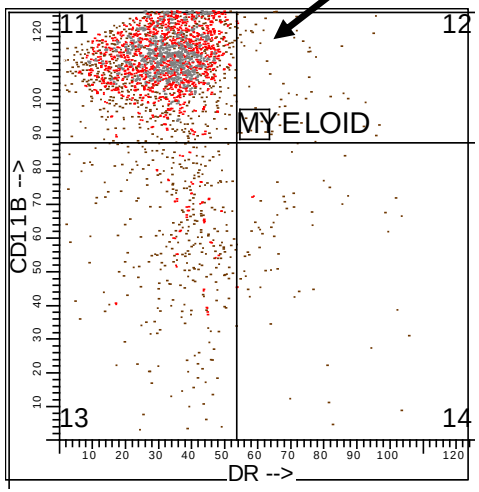


Poca viabilidad(4%)

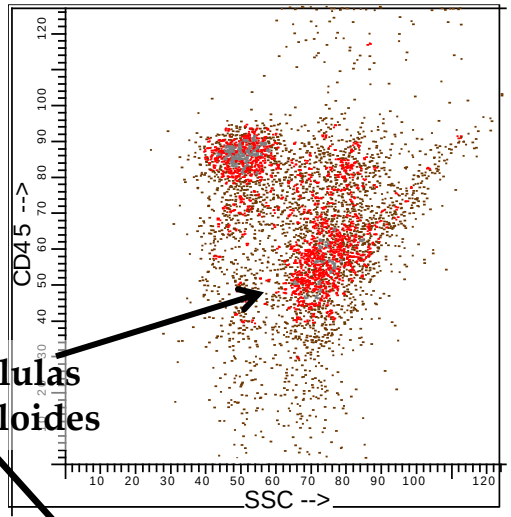
Impacto de la edad de la muestra en el análisis inmunofenotípico



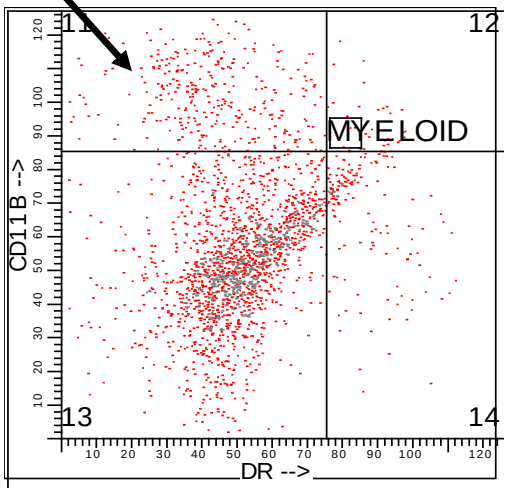
Células mieloides



24 hs post recolección
Viabilidad 97%



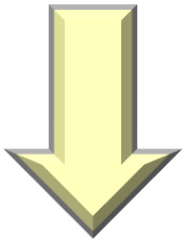
Células mieloides



48 hs post recolección
Viabilidad 92%

Soluciones estabilizantes

Preservan y estabilizan las muestras por más de 10 días



Mantienen la viabilidad y la integridad celular

Sangre

Médula ósea

LCR y otros fluidos corporales

Soluciones estabilizantes cont.

- ✓ Almacenamiento → 4°C, 10 días
  20°-24°C, 7 días
  37°C, 4 días
- ✓ Antígenos intracelulares → 3 días
- ✓ Estabilizante/sangre → 1:5

✓ Sangre de rata, ratón, cerdo, oveja, caballo, etc → la cantidad requerida de estabilizante varía entre las distintas especies → determinar la *dilución óptima requerida*

✓ *Mtras estabilizadas* →no para ensayos funcionales

Tipos de muestra

- Sangre periférica (SP)
- Médula ósea (MO)
- Líquidos de punción: LCR, líquido pleural
- Tejidos linfoides: ganglio, bazo, timo
- Tumores sólidos
- Piel
- Biopsias de mucosas
- Células en cultivo
- etc…

Células en suspensión

Consideraciones a tener en cuenta…

Tipo de muestra	Anticoagulante o médio de recolección*	Estabilidad (horas)	Temp. de conservación (°C)	Volumen mínimo*	Consideraciones
SP	EDTA o heparina	12-48	18-25	5	El EDTA no permite estudios citogenéticos.
MO	Heparina o EDTA	12-48	18-25	2	La heparina no permite estudios de biología molecular.
LCR	TRASNFIX®	48-72	2-8	5	
Líquidos de punción	Heparina	12-24	2-8	5	
Ganglio o fragmento tisular	Solución fisiológica	12-24	2-8	-	

*Considerar la edad del paciente, datos clínicos, tipo y momento del estudio, y estudios adicionales requeridos.

SP: Sangre periférica, MO: Médula ósea, LCR: Líquido cefaloraquídeo.

Conservación de las muestras

La calidad de los resultados es inversamente proporcional al tiempo transcurrido desde la obtención de la muestra y al grado de manipulación

Se recomienda usar muestras frescas, recién obtenidas

Tipos de muestra

- Sangre periférica (SP)
- Médula ósea (MO)
- Líquidos de punción: LCR, líquido pleural
- Tejidos linfoides: ganglio, bazo, timo
- Tumores sólidos
- Piel
- Biopsias de mucosas
- etc…

Frasco estéril con sol. Fisiol. o RPMI+SFB

Células en suspensión

Procesamiento de una muestra sólida

- Método enzimático:

  Tripsina, Proteasa neutra, Colagenasa y Dnasa

- Método químico

  Triton X-100 o Nonidet P-40

- Método mecánico

Células en suspensión

Elección del método de disgregación depende:

- Naturaleza y tamaño del tejido o cultivo
- Uso posterior de las cél. obtenidas

Es imprescindible conocer bien el o los epitopes que queremos investigar en esa muestra.

Procesamiento de una muestra sólida

- Método enzimático:

  Tripsina, Proteasa neutra, Colagenasa y Dnasa

- Método químico

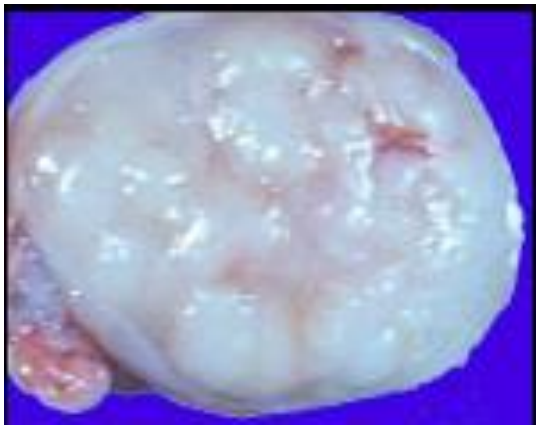
  Triton X-100 o Nonidet P-40

- Método mecánico

Células en suspensión

Procesamiento de muestra sólida

Método mecánico



Tejido linfoide

Células en suspensión

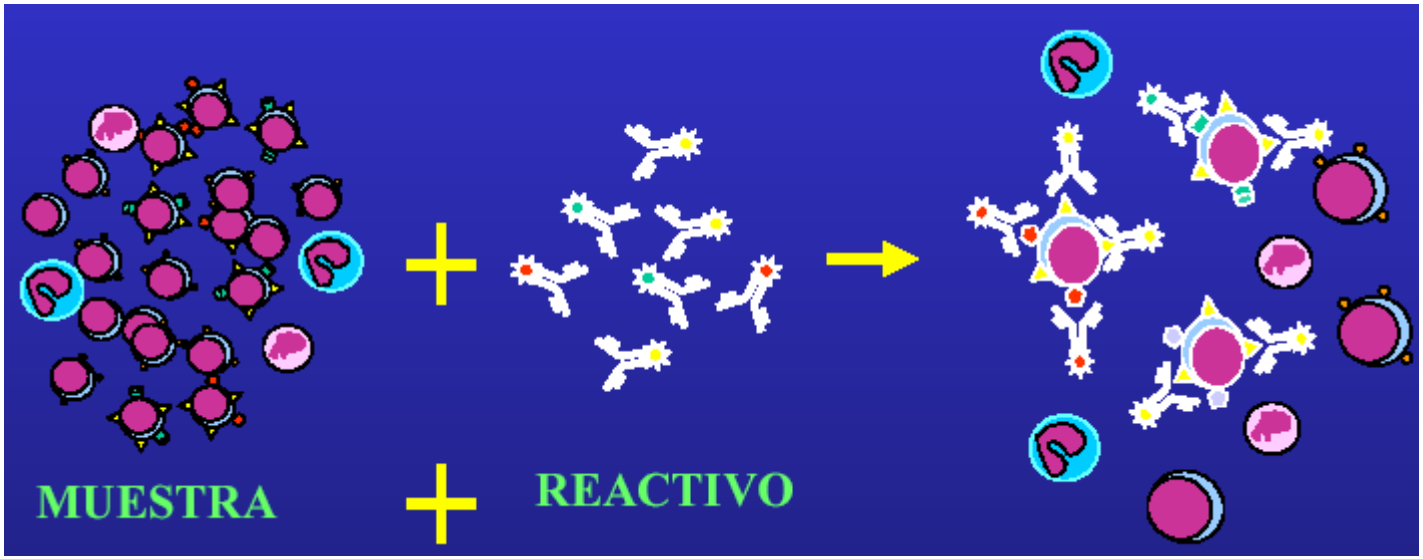
Tipos de muestra

- Sangre periférica (SP)
- Médula ósea (MO)
- Líquidos de punción: LCR, líquido pleural
- Tejidos linfoides: ganglio, bazo, timo
- Tumores sólidos
- Piel
- Biopsias de mucosas
- Células en cultivo
- etc…

Células en suspensión

Técnica de inmunomarcación para CF

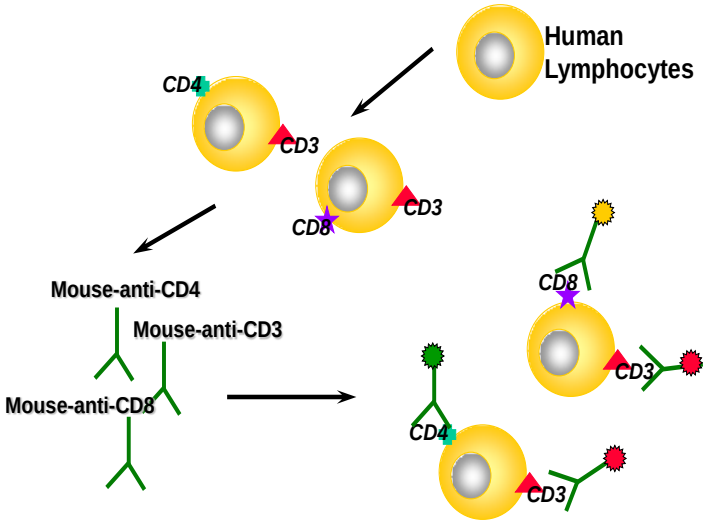
- Células en suspensión
- Anticuerpos monoclonales conjugados con un fluorocromo



¿Qué son los anticuerpos monoclonales?

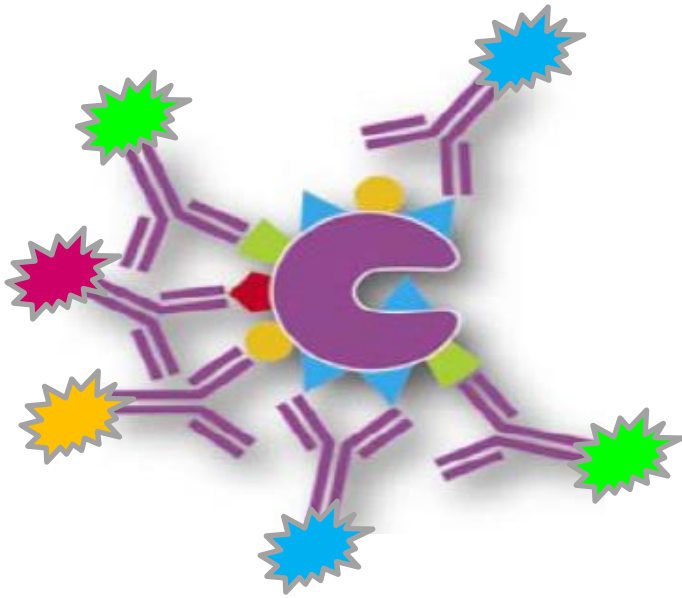
→ Son producidos por un único clon específico de linfocitos B, pertenecen a una clase y subclase determinadas y tienen una especificidad única frente a un antígeno determinado.

→ Son extremadamente puros.



Fluorocromos

Son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente.



- **FITC** Isotiocianato de fluoresceina
- **PE** Ficoeritrina
- **PerCP** Proteína Peridinina de la clorofila
- **PE-Cy7** Tandem PE-Cianina 7
- **APC** Aloficocianina
- **APC-Cy7** Tandem APC-Cianina 7
- **APC-H7** Tandem APC-H7

Fluorocromos

Tabla 3. Ejemplos de laseres y fluorocromos utilizados en aplicaciones de citometría de flujo.

FUENTE DE EXCITACIÓN (en nm)	CANAL DE FLUORESCENCIA	EJEMPLOS DE FLUOROCROMOS	EXCITACIÓN (nm)	EMISIÓN (nm)	CARACTERÍSTICA PARA APLICACIÓN EN CITOMETRÍA DE FLUJO
488 (laser azul)	VERDE	FITC	494	519	Alta Eficiencia de transferencia de Energía, 3-5 moléculas por conjugado (anticuerpo)
	AMARILLO	PE	496, 564	578	Tiene 34 fluorocromos de ficoeritrobilina por molécula lo que lo hace altamente "brillante"
	ROJO	PerCP-Cy 5.5	482	695	Conjugado doble. El PercP transfiere su energía a la molécular de Cianina dando una emisión más larga que el PerCP
	ROJO	PerCP	482	678	sólo Fenómeno de Fotodegradación (1)
635 (laser Rojo)	ROJO	APC	650	660	Tiene 6 cromóforos de ficocianobilina por molécula (similar a la ficoertitribilina del PE) lo que lo hace también muy "brillante"
405/407 (laser violeta)	VERDE	AmCyan	457	491	Requiere de una óptica apropiada para ser visualizado. Alta estabilidad y bajo ruido de fondo (background).
	AZUL	Pacific Blue® (2)	405	455	Use este conjugado para sus antigenos/proteinas más brillantes.
	AZUL	Alexa Fluor® 405 (2)	401	421	Es un fluorocromo menos brillante que Pacific Blue®
633 (laser rojo)	INFRAROJO	APC-Cy7	650	785	Se requieren filtros especiales para su detección

Titulación de Anticuerpos

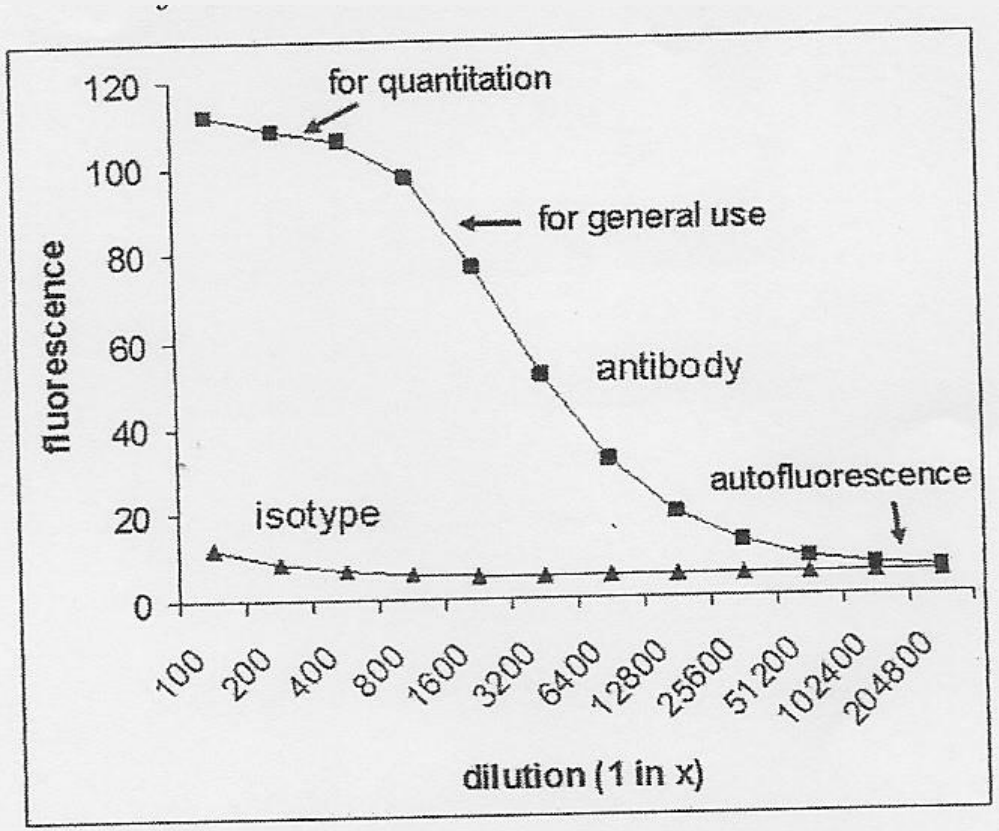
Principales objetivos:

✓ Optimizar el consumo, ajustando la cant. de reactivo y bajando costos.

✓ Disminuir el ruido de fondo debido a uniones no específicas o de baja afinidad por el exceso de anticuerpo.

✓ Aumentar la sensibilidad del ensayo.

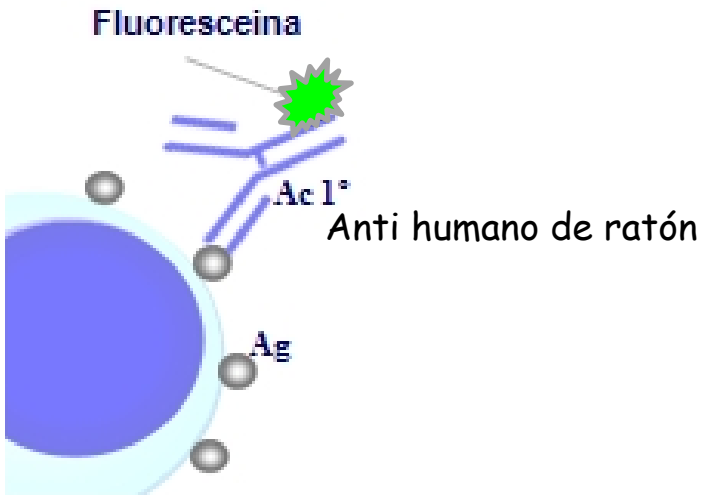
Titulación de Anticuerpos



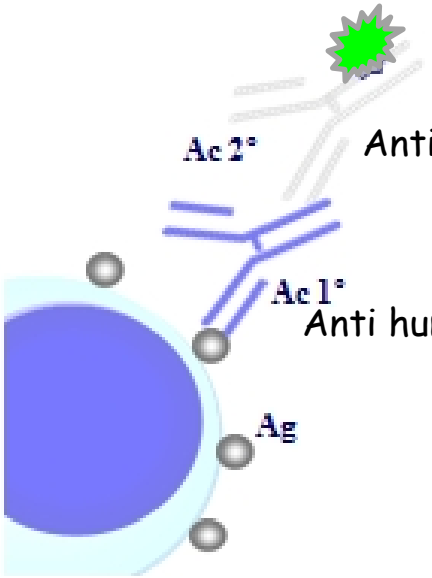
- ✓Células positivas
- ✓Diluciones al medio del Ac y su control de isotipo

Técnica de inmunofluorescencia IF

IF directa

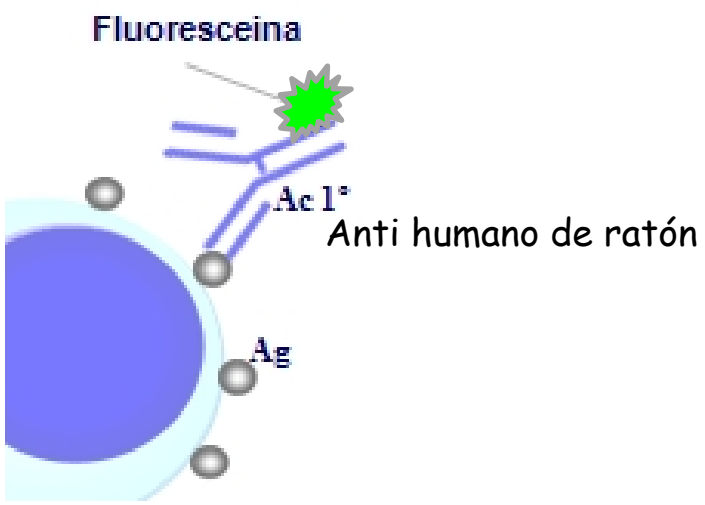


IF indirecta

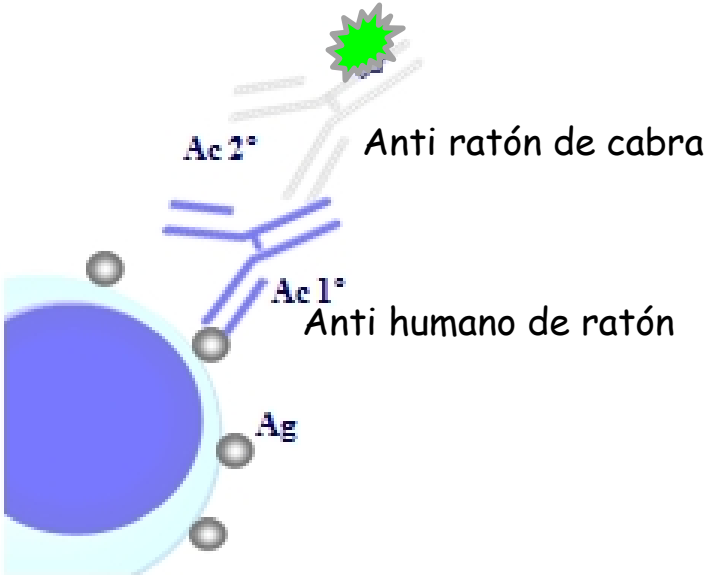


Técnica de inmunofluorescencia IF

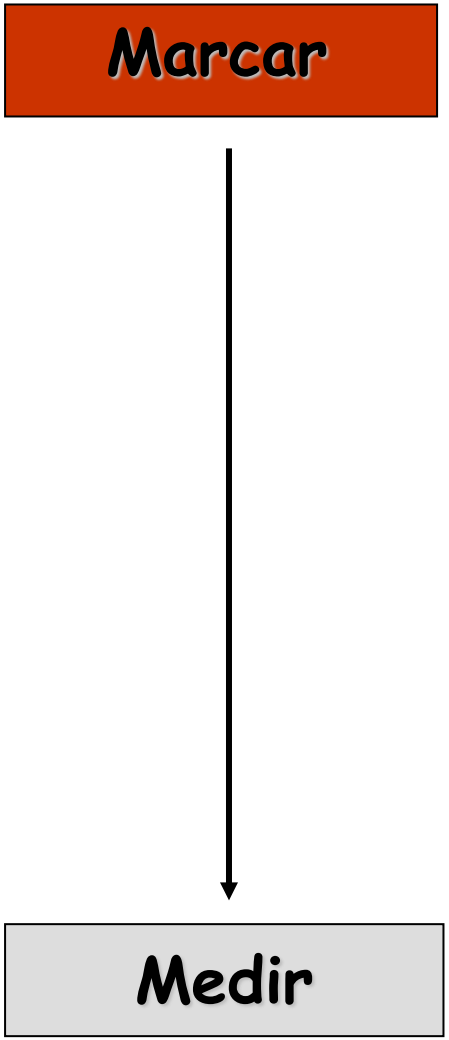
IF directa



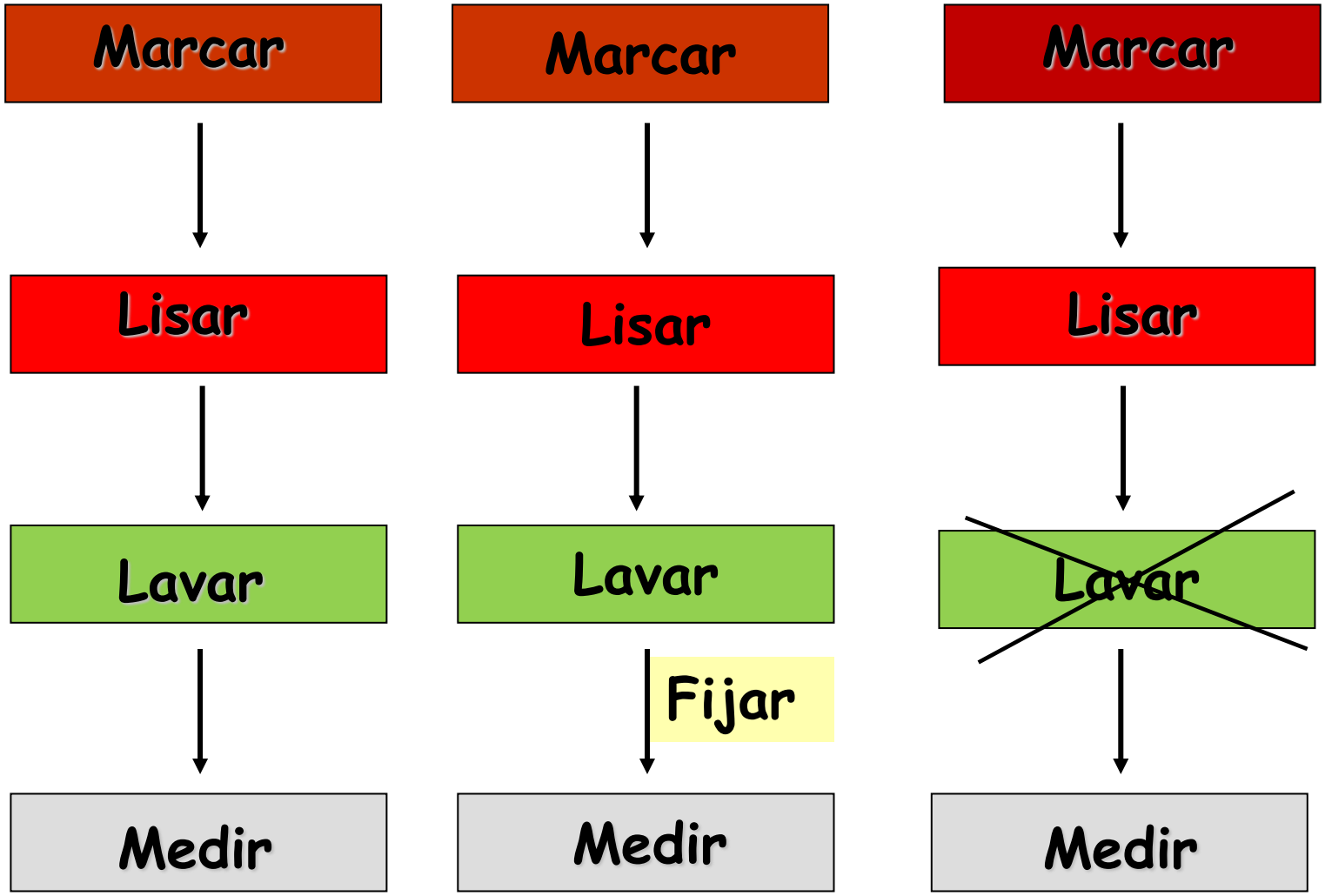
IF indirecta



Técnica de inmunofluorescencia IF



Procedimientos de marcación

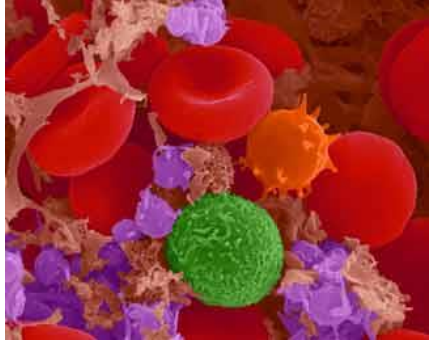


La elección del procedimiento y de los reactivos a utilizar para la marcación de leucocitos depende del objetivo del experimento

Criterios:

- Poca variación en FSC y SSC
- Buena separación entre las diferentes principales poblaciones de leucocitos
- Mínima pérdida celular
- Preservar la intensidad de los fluorocromos
- Mantener la estabilidad de los fluorocromos en tandem
- Realización fácil y rápida

Lisis de eritrocitos



- Cloruro de amonio

- Reactivos comerciales:
  - FACS Lysing Solution (BD)
  - QuickLysis (Cytognos SL)
  - VersaLyse (Beckman Coulter)

Lisantes comerciales

- **Con lavado:** están compuestos por formaldehído y dietilenglicol (lisa y fija). Se usa después de la marcación.

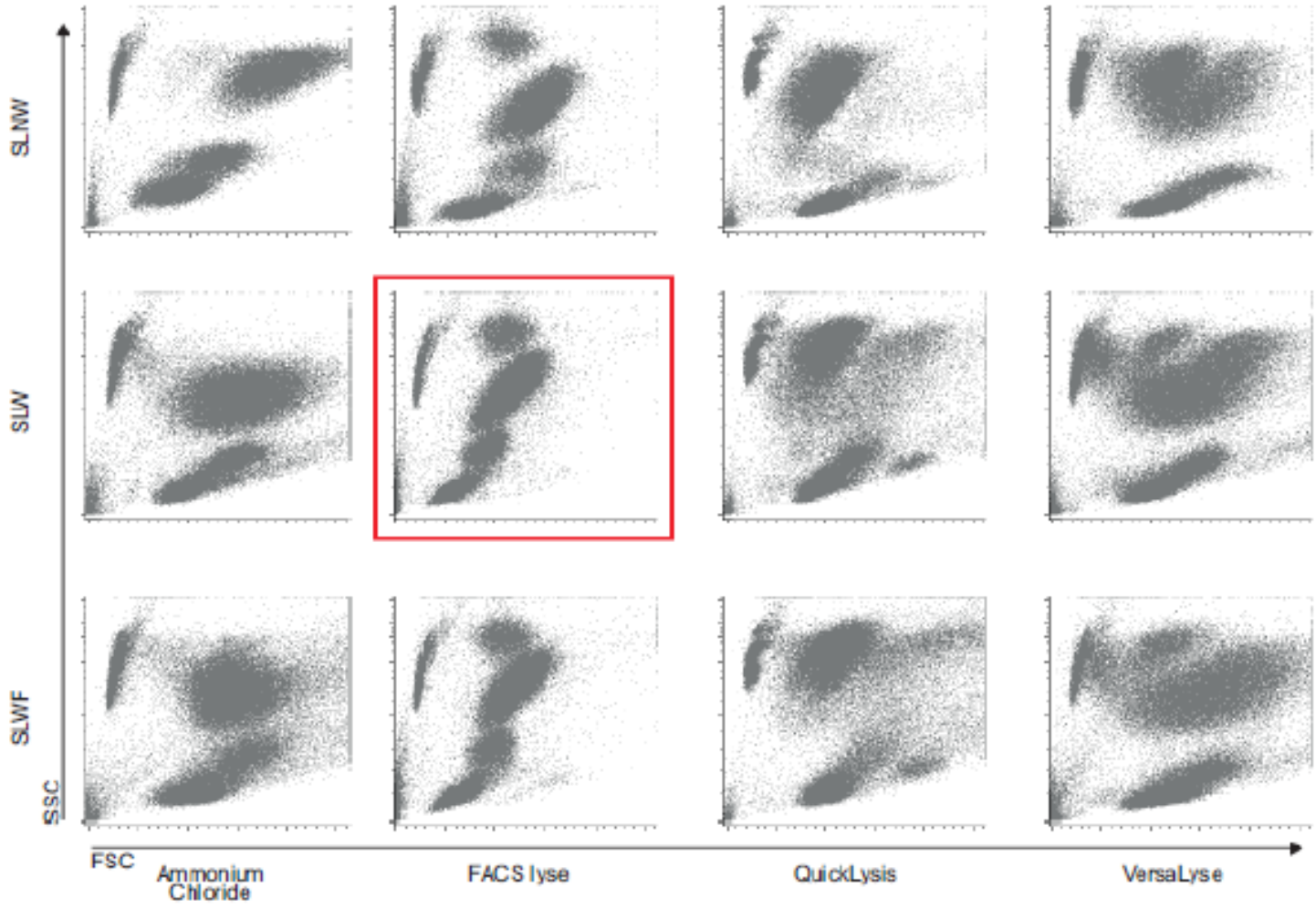
- **Sin lavado:** se usa después de la marcación. Evita la pérdida de células. Útil en la cuantificación de antígenos.

Razones de una lisis incompleta:

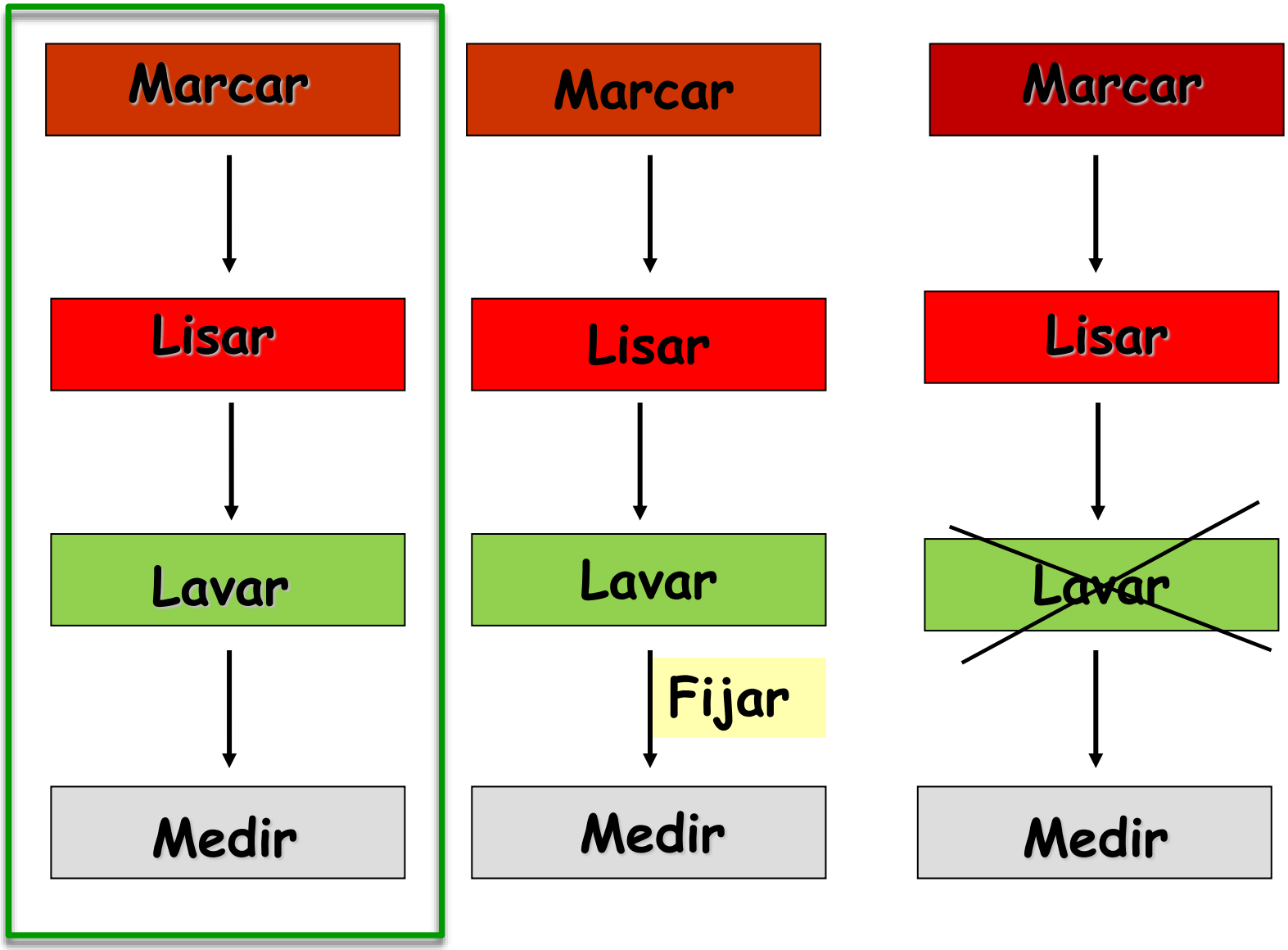
- Edad de la muestra
- Temp de la solución de lisis
- Insuficientemente vortexeada

Repetir el procedimiento de lisis

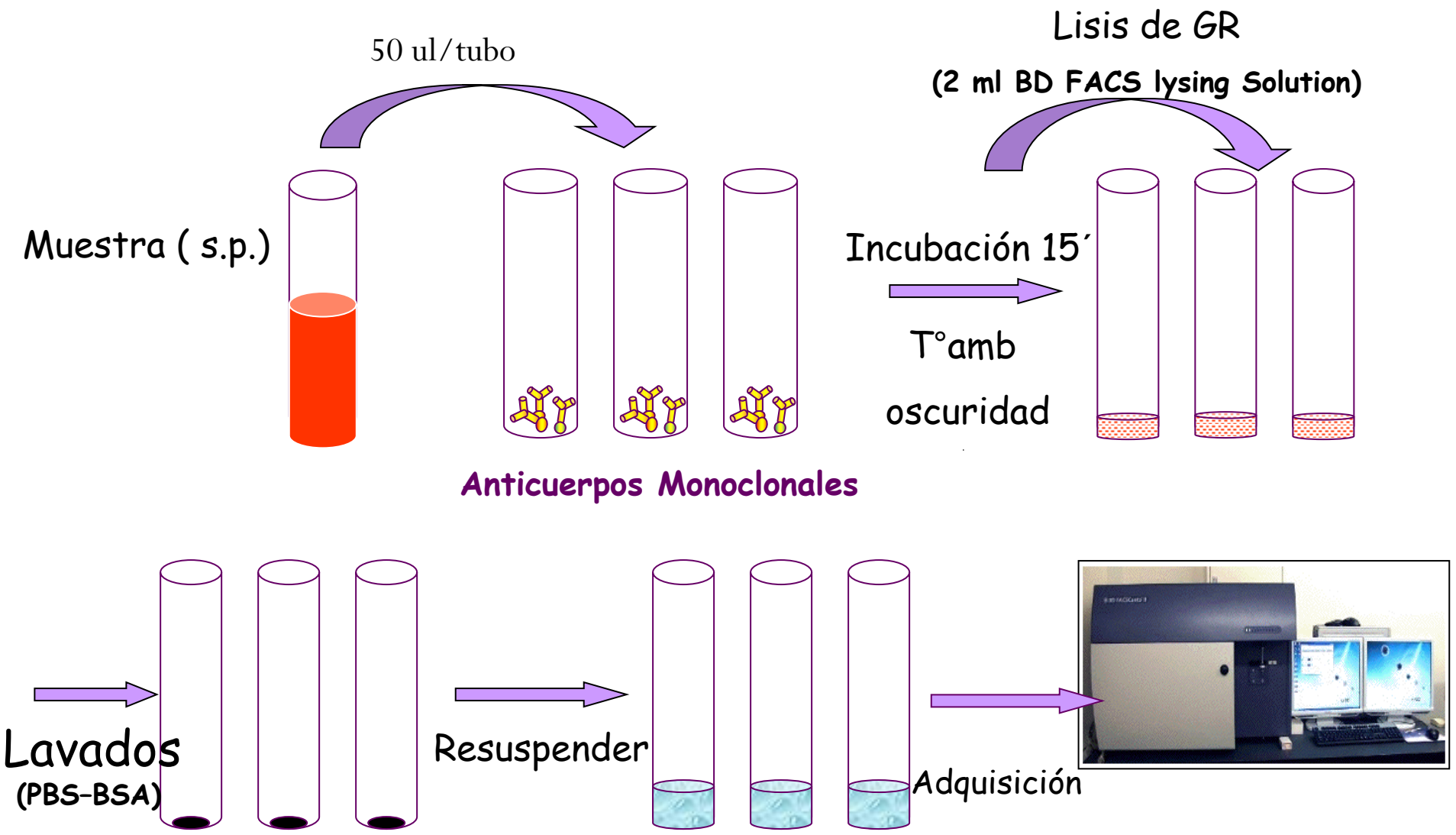
Estudio comparativo de distintas soluciones de lisis y protocolos de marcación



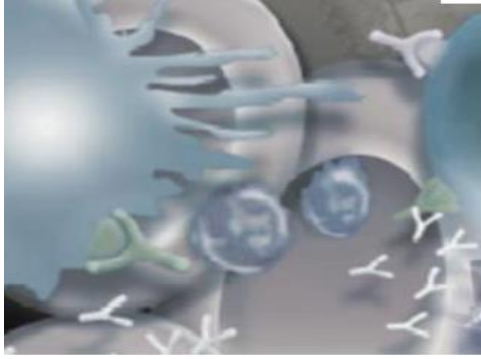
Protocolos de marcación



Protocolo de marcación de Antígenos de superficie con anticuerpos monoclonales



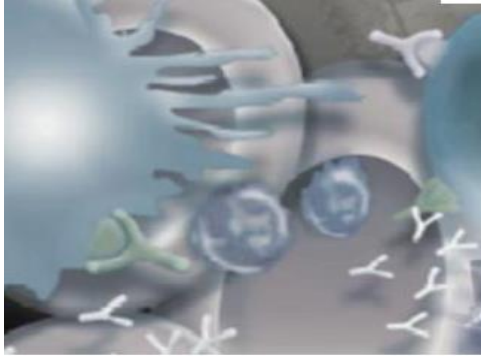
Marcación de cadenas de Igs



- Requiere 2 pasos de lavado previos a la marcación

Máxima intensidad de marcación de Igs

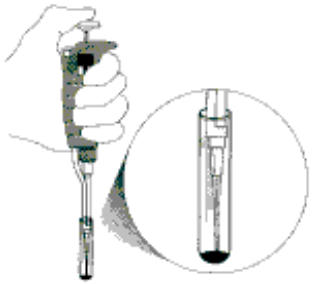
Protocolo de lavado



1- 300 µl mtra + 10 ml de PBS-Alb-NaN3
2- Mezclar
3- ↺ 5' a 540g
4- Descartar sobrenadante con Pipeta Pasteur
5- Agregar 10 ml de PBS-Alb-NaN3
6- Mezclar
7-↺ 5' a 540g
8- Descartar sobrenadante con Pipeta Pasteur
9- Resuspender el pellet en 200-300 µl de PBS-Alb-NaN3

Estudio de Ags. de superficie

IFD



50-60 µl mtra + Acs. Monoclonales*

↓ Incubar 15' en oscuridad

Agregar 2 ml de lisante (10´)

↓ Centrifugar 5' a 1800rpm

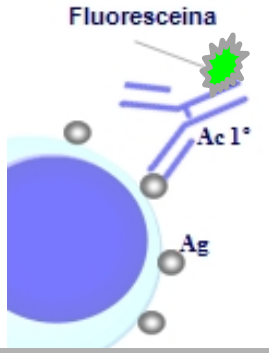
Lavar con PBS-Alb-NaN3 (2ml)

↓ Centrifugar 5' a 1800rpm

Resuspender con 400 µl PBS-Alb-NaN3

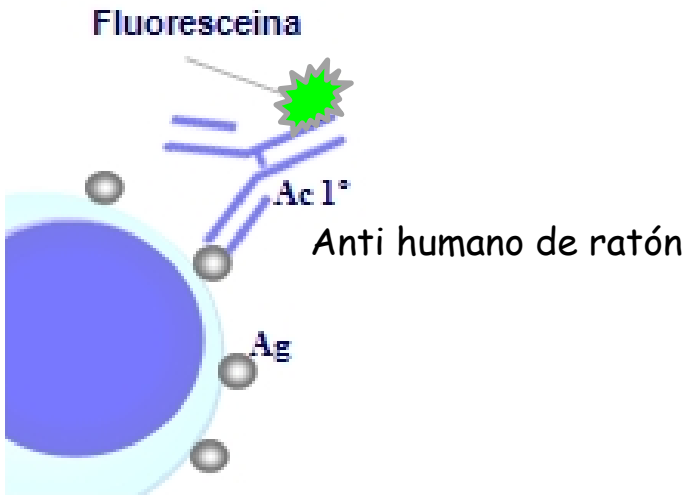
↓

Adquisición de la muestra

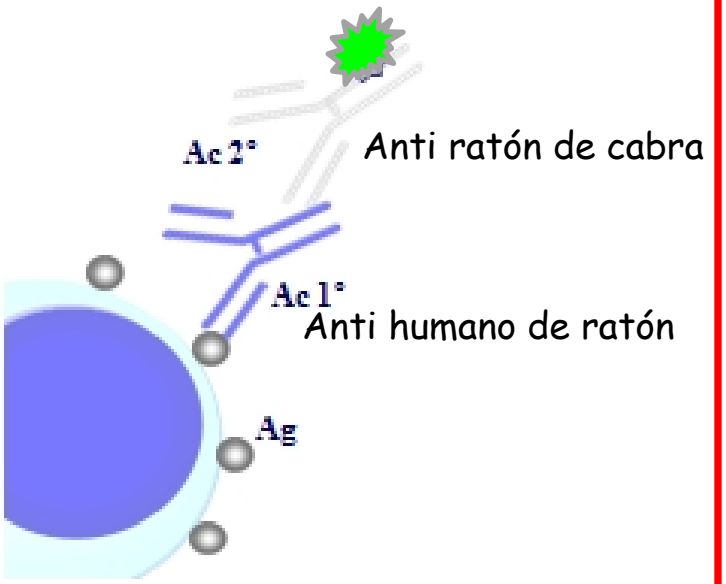


Técnica de inmunofluorescencia IF

IF directa

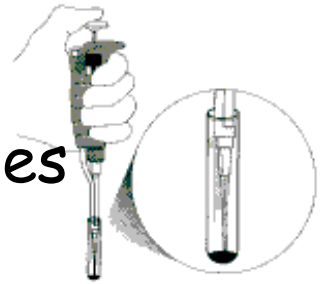


IF indirecta



Estudio de Ags. de superficie

IFI



Células en suspensión + Acs. Monoclonales

↓ Incubar 20'

Lavar con PBS-Alb

↓ ↺ 5' a 400g

+ 2° Ac*

↓ Incubar 20' en oscuridad

Lisis con ClNH4

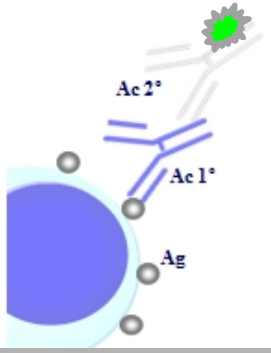
↓ ↺ 5' a 400g

Lavar con PBS-Alb

↓

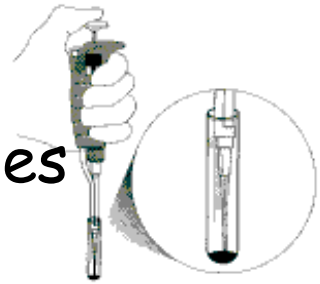
Resuspender con PBS-Alb

Adquisición de la muestra



Estudio de Ags. de superficie

IFI



Células en suspensión + Acs. Monoclonales

↓ Incubar 20'

Lavar con PBS-Alb

↓ ↺ 5' a 400g

+ 2° Ac*

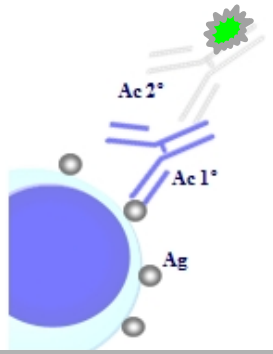
↓ Incubar 20' en oscuridad

Lisis con ClNH4

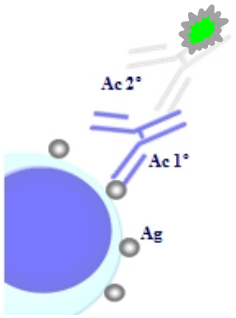
↓ ↺ 5' a 400g

Lavar con PBS-Alb

La múltiple marcación es difícil, ya que si todos los Acs primarios son de ratón, el 2° Ac se unirá a todos los Acs.



Estudio de Ags. de superficie
IFI combinada con IFD



1- Incubar con Ac. primario sin marcar. Lavar.

2- Incubar con Ac. secundario marcado. Lavar.

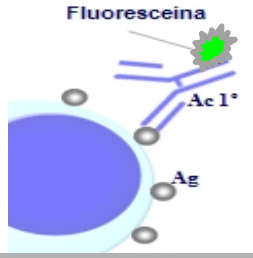
IFI

3- Incubar con **suero de ratón** (bloquea sitios no reactivos en el Ac. secundario).

4- Incubar con Ac. primario marcado. Lavar.

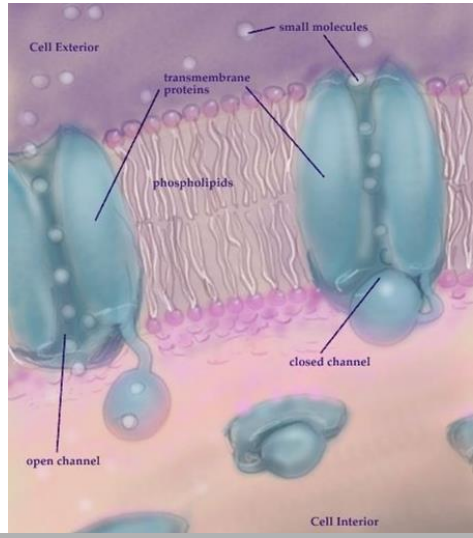
IFD

5- Adquisición de la muestra.



Estudio de Ags. intracitoplasmáticos

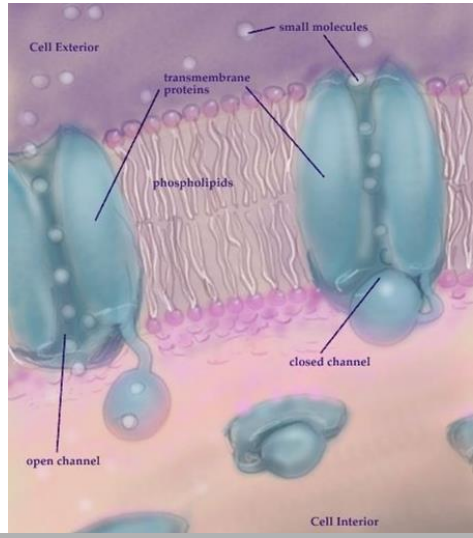
- Fijación
- Permebilización



Inconvenientes:

- Marcación inespecífica: > en células permeabilizadas que en células intactas.

- Alteración o solubilización de ciertos Ags.



Protocolo de marcación intracitoplasmática

1- Marcación de Ags. de superficie

2- Fijación de las células

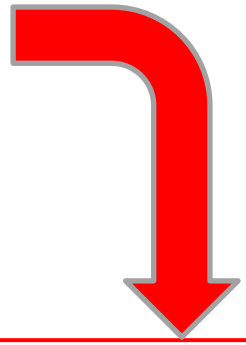
3- Permeabilización y marcación de Ags. intracitoplasmáticos.

Protocolo de marcación intracitoplasmática

1- Marcación de Ags. de superficie

2- Fijación de las células

3- Permeabilización y marcación de Ags. intracitoplasmáticos.



Reactivos comerciales:
Rvo. A: fija
Rvo. B: permeabiliza

Protocolo de marcación intracitoplasmática

1- Marcación de Ags. de superficie

- ✓Células vivas no fijadas
- ✓Fijadores pueden modificar ciertos Ags.
- ✓Luego de marcar, fijación con PAF

2- Fijación de las células

3- Permeabilización y marcación de Ags. intracitoplasmáticos.

Protocolo de marcación intracitoplasmática

1- Marcación de Ags. de superficie

2- Fijación de las células

- ✓ Crosslink de las proteinas
- ✓ PAF 0,5%-1%
- ✓ Etanol 70%
- ✓ Metanol absoluto

✓Concentración
✓Tiempo
✓Temperatura
✓ Compatibilidad con fluorocromos
✓ Compatibilidad con marcadores de superficie

3- Permeabilización y marcación de Ags. intracitoplasmáticos.

Protocolo de marcación intracitoplasmática

1- Marcación de Ags. de superficie

2- Fijación de las células

3- Permeabilización y marcación de Ags. intracitoplasmáticos.

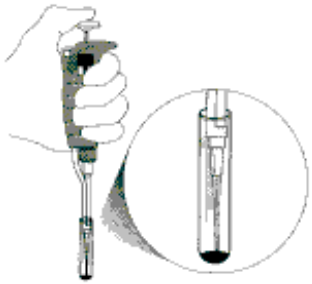
- ✓ Tween 20
- ✓ Saponina
- ✓ Metanol
- ✓ Triton X100

- ✓Concentración
- ✓Tiempo
- ✓Temperatura
- ✓ Compatibilidad con fluorocromos
- ✓ Compatibilidad con marcadores de superficie

Reactivos comerciales para fijación y permeabilización

- Variedad de marcas comerciales
- Buenos resultados para la mayoría de los Ags intracelulares excepto para los del ciclo celular (BrdU, Ki67, PCNA)
- Limitación: Ags sensibles a la fijación con PAF

Estudio de Ags. intracitoplasmáticos



50-60 µl mtra + Acs. Monoclonales*

↓ Inc. 15' en oscuridad / Lavado

100 µl Rvo. A

↓ Inc. 5´ en oscuridad + Lisante/ inc. 10´/ ↺ 5' a 1800 rpm

100 µl Rvo. B + Acs. Monoclonales*

↓ Inc. 15' en oscuridad / Lavado

Resuspender con 400 µl PBS-Alb-NaN3

↓

Adquisición de la muestra

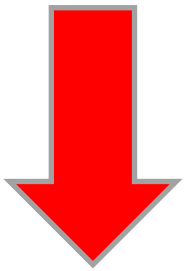
Variables en el procedimiento fijación-permeabilización

- Concentración de Ac.
- Elección del agente fijador
- Concentración del agente fijador
- Tiempo de incubación con el agente fijador
- Elección del agente permeabilizante

Es imprescindible optimizar todas estas variables para lograr aumentar la marcación específica y disminuir el background

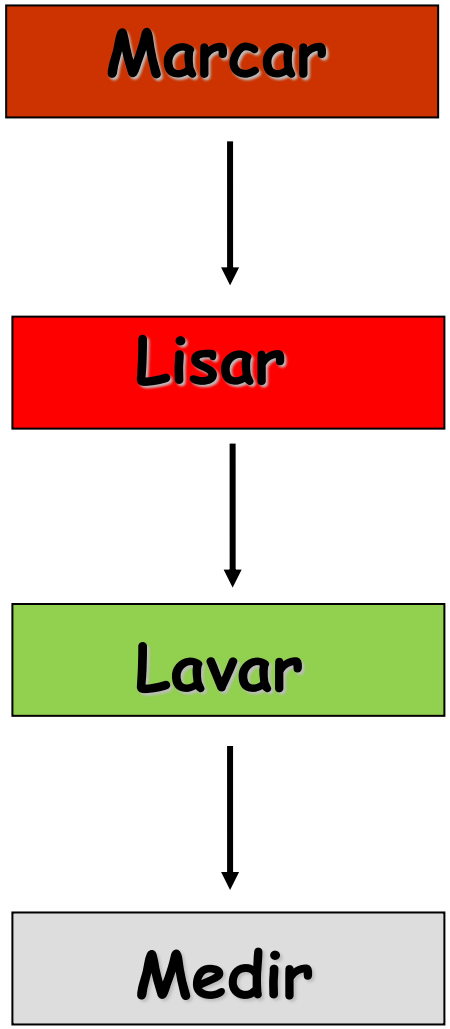
Procesamiento de muestras con bajo n° de células o para evaluar EMR (Bulk lisis)

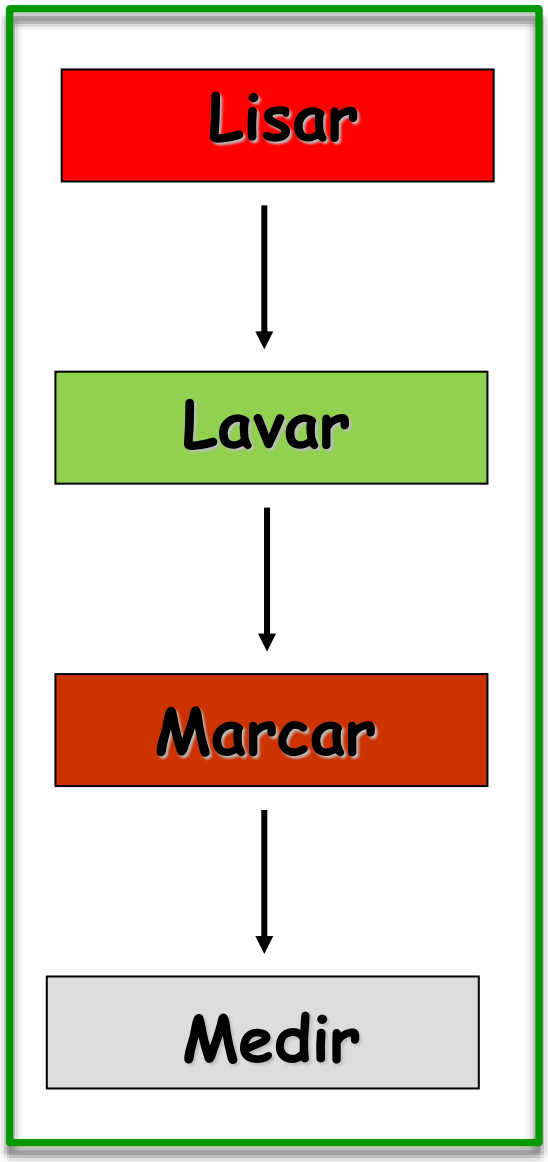
Lisis previa con CLNH4



Para concentrar

Técnica de inmunofluorescencia IF





Lisis de eritrocitos

- ✓ Solución madre 10X
- ✓ Solución de uso 1X
- ✓ pH 7,1-7,4

SP + $ClNH_4$

↓ mezclar

Inc. 10´ a TA

↓ ↺ 5´ 2000 rpm

Descartar SN

↓

Lavar con PBS/Alb/NaN3

↓ ↺ 5´ 2000 rpm

Descartar SN

↓

Resuspender en PBS/Alb/NaN3

Procesamiento de muestras de LCR

Variable	Solución
Baja viabilidad	LCR estabilizado
Presencia de IgG	Lavado con PBS
Baja cc celular	Centrifugar y concentrar
Bajo nº de células	CFM (6 colores o más)
Contaminación con SP	Identificar botón hemático post centrifugación y PMN

Procesamiento de muestras de LCR

Tiempo	Viabilidad
30 min	50%
60 min	20%
90 min	10%

Mtra. estabilizada (ej. Transfix)

Transportar al laboratorio

Duk et al, J Neurol Sci 1994; 121; 74-78
Graaf et al, J Nuerol 2011
Kraan et al, Current Protocols Cytometry 2008

Protocolo LCR

LCR (estabilizado)

↓

Agregar 2ml PBS

↓

↺ y concentrar (300 µl)

↓

Marcar 1/3 de la mtra

↓

Lisar GR

↓

Lavar y ↺

↓

Resuspender y adquirir

Protocolo LCR

1/3 del LCR

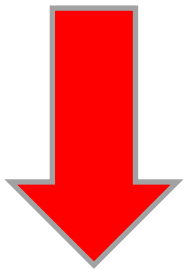
Negativo

Positivo

Remarcar 2/3 de la mtra restante con el mismo panel o con un panel adaptado.

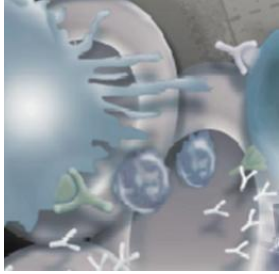
Adquisición de la muestra

Inmediatamente después de marcar o dentro de la hora



Almacenar a 4°C en oscuridad

Estudio de citoquinas



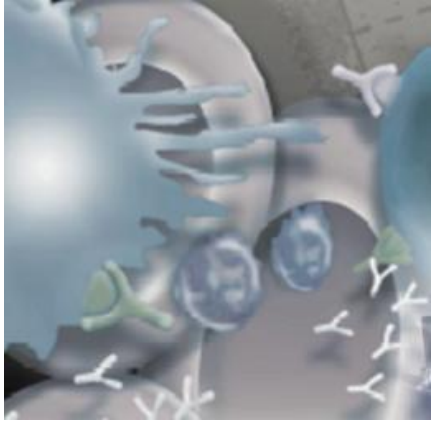
- Las citoquinas son factores solubles liberados por distintos tipos de células como consecuencia de la activación en respuesta a algún estímulo.

- Distintos tipos de células liberan distintos set de citoquinas.

- Gralmente se estudia la expresión de citoquinas intracelulares en suspensión de linfocitos (sangre entera o MNN).

- Sangre periférica con heparina (EDTA interfiere con el proceso de estimulación).

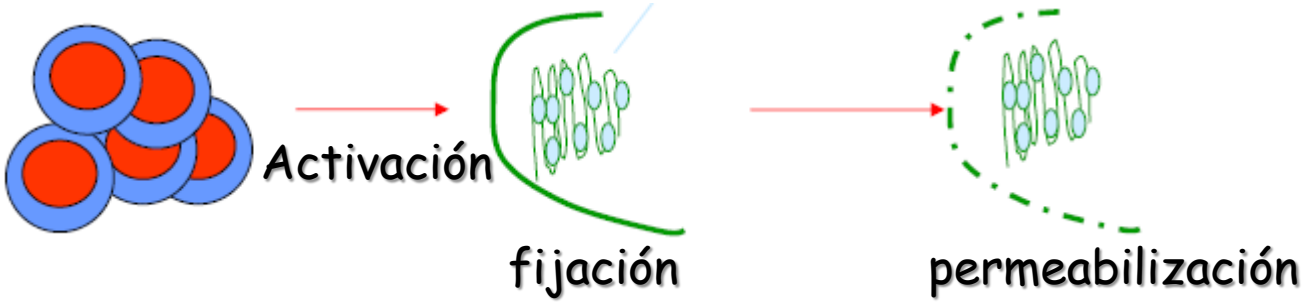
Estudio de citoquinas



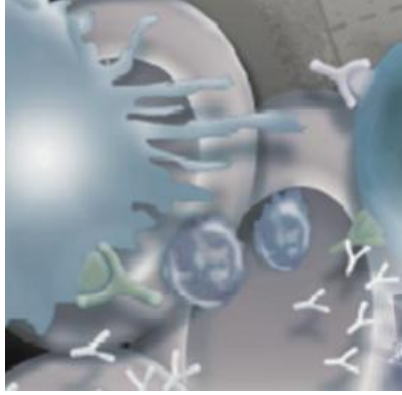
1- Estimulación de las células

2- Fijación con PAF

3- Permeabilización con saponina



Estudio de citoquinas



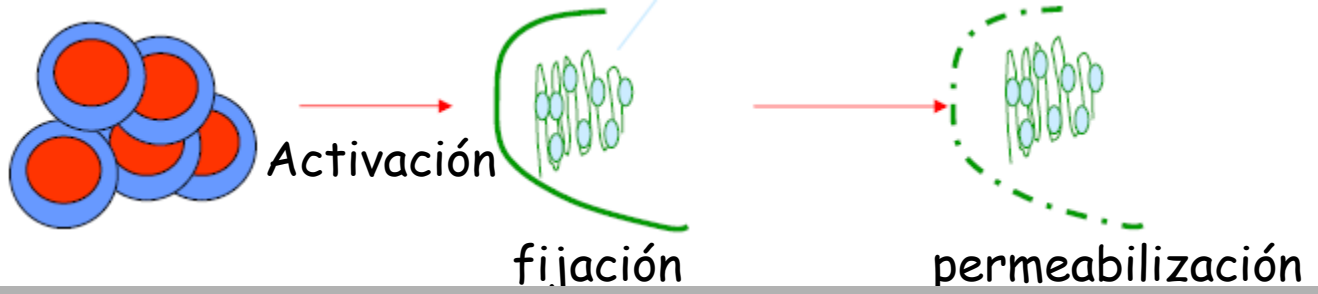
1- Estimulación de las células

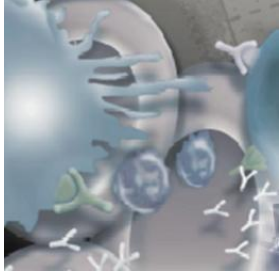
- ✓Estimuladores no específicos: PMA, PHA, Ionomicina
- ✓Acs. monoclonales anti-CD3 o anti-CD28
- ✓Estimuladores policlonales

Suspensión celular + estimuladores → inc. 4-6 hs. Agregar brefeldina A o monensina para inhibir la secresión de citoquinas.

2- Fijación con PAF

3- Permeabilización con saponina





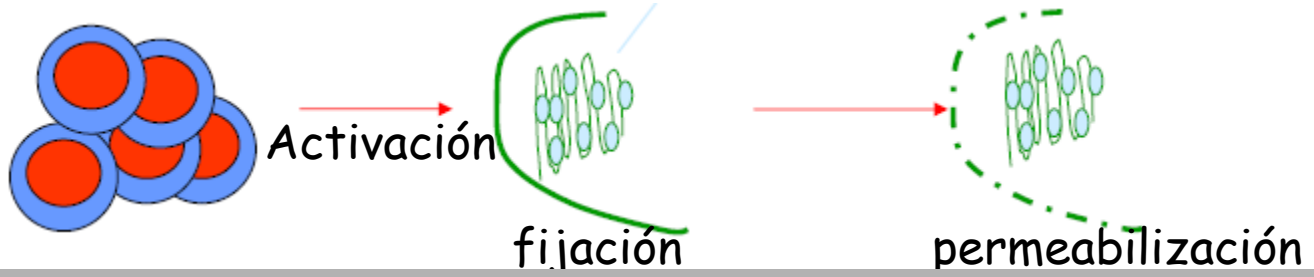
Estudio de citoquinas

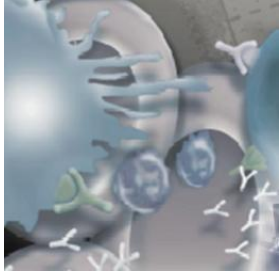
1- Estimulación de las células

2- Fijación con PAF

PAF preserva la antigenicidad de las citoquinas y demás características de las células

3- Permeabilización con saponina





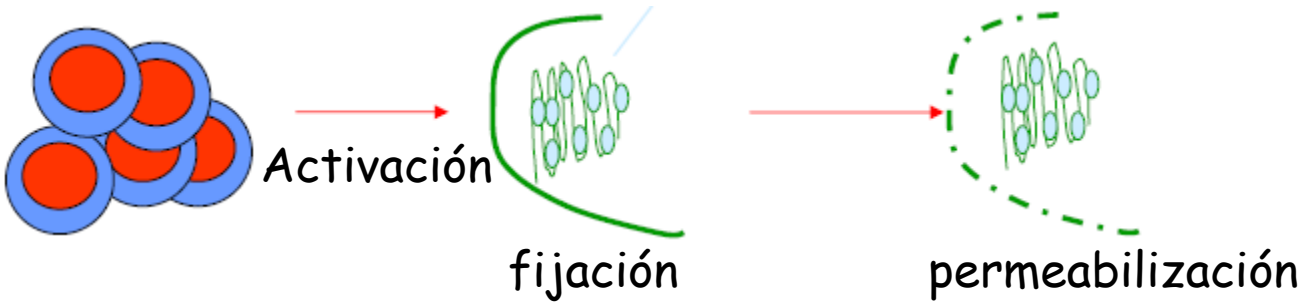
Estudio de citoquinas

1- Estimulación de las células

2- Fijación con PAF

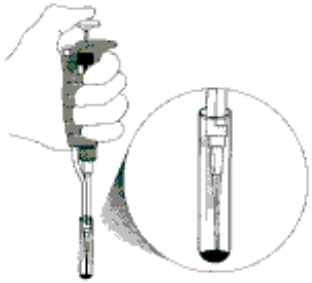
3- Permeabilización con saponina

Permite que los Acs entren al citoplasma y reaccionen con las citoquinas acumuladas intracelularmente



Estudio de Ags. nucleares – Método metanol

Ags. de proliferación celular: PCNA, Ki-67



Células en suspensión + Acs. Monoclonales*

↓ Inc. 20' en oscuridad / Lavado

Fijación con Rvo. A

↓ Inc. 2´-3´ en oscuridad

Metanol absoluto frío -Vortex

↓ Inc. 10' a 0°-4°C / Lavado

Permeabilización con Rvo. B + Acs. Monoclonales*

↓ Inc. 30' en oscuridad a TA / Lavado

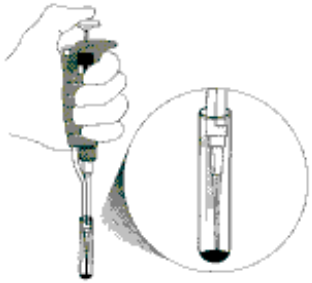
Resuspender con PBS-alb

↓

Adquisición de la muestra

Estudio de Ags. nucleares – Método metanol

Ags. de proliferación celular: PCNA, Ki-67



Células en suspensión + Acs. Monoclonales*

↓ Inc. 20' en oscuridad / Lavado

Fijación con Rvo. A

No usar Acs. conjugados con PE para la detección de Ags de sup.

oscuridad

Met ex

4°C / Lavado

Permeabiliza noclonales*

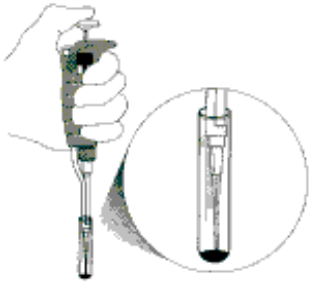
↓ Inc. 30' en oscuridad a TA / Lavado

Resuspender con PFA 0,5%

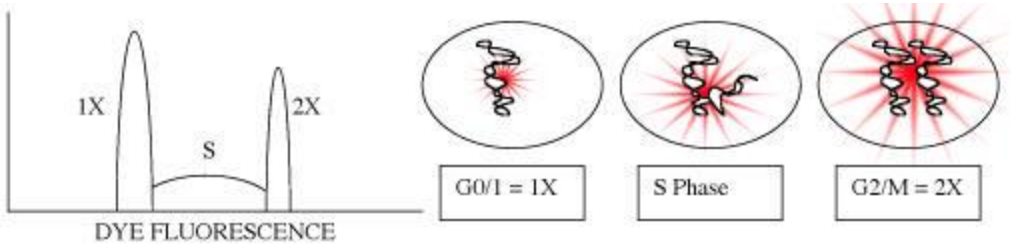
↓

Adquisición de la muestra

Estudio de contenido de ADN



- Colorante fluorescente: IP
- Inconveniente: IP es un intercalante de ADN y ARN de doble cadena.
- Su utilización requiere del empleo de agentes permeabilizantes y del tratamiento con ARNasa.
- Método más comúnmente usado: Etanol 70%



En resumen:

- Conocer bien el o los Ags sujetos a estudio.

- Optimizar todas las variables para lograr aumentar la marcación específica y disminuir el background.

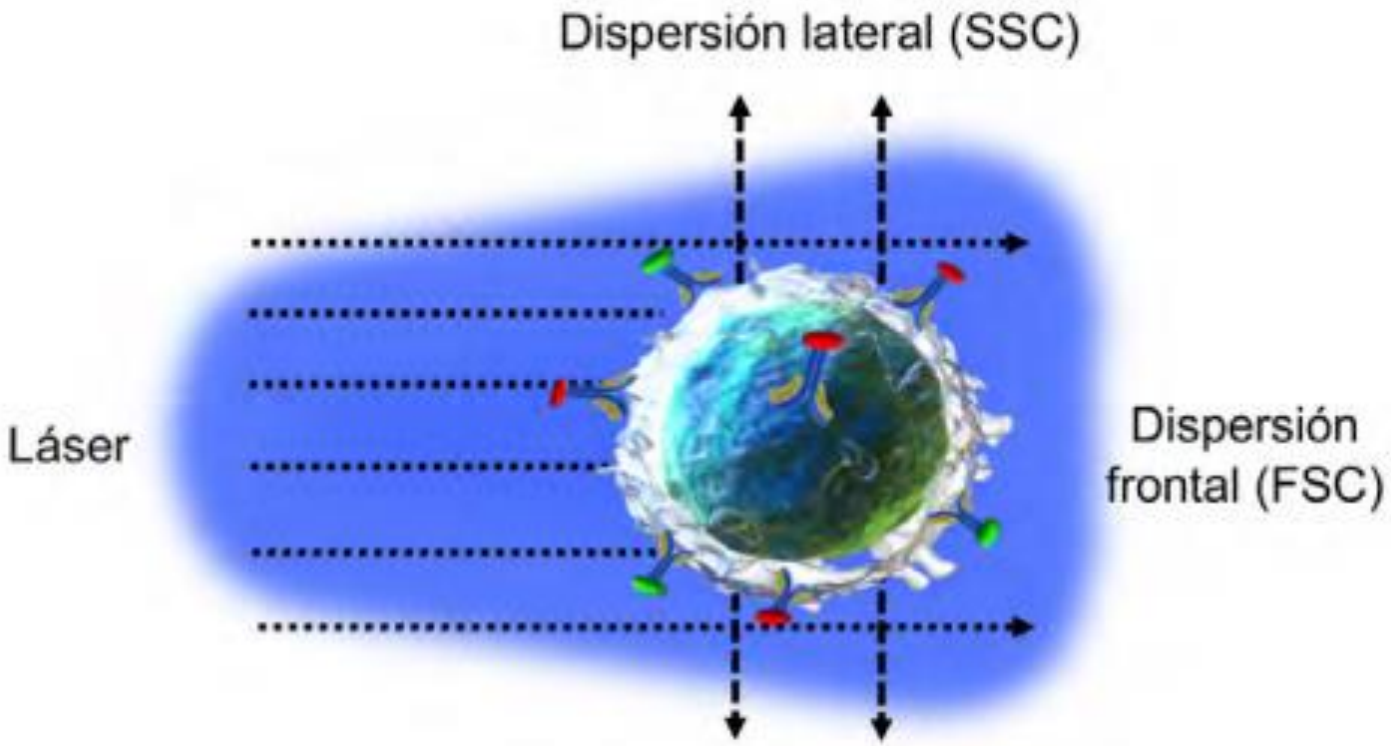
Análisis de muestras

Tipos de señales

- Señales de dispersión
- Señales de fluorescencia

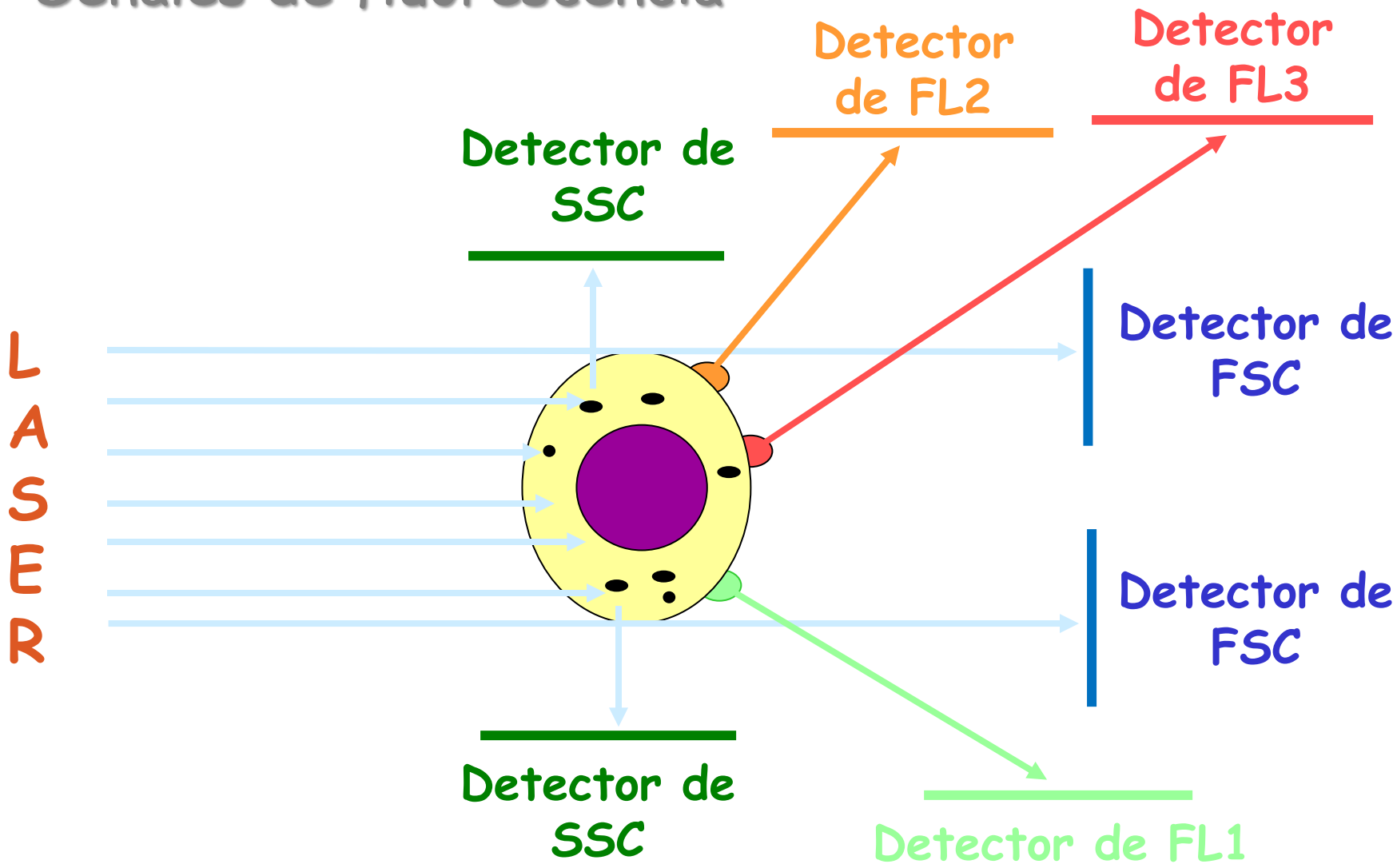
Tipos de señales

Señales de dispersión

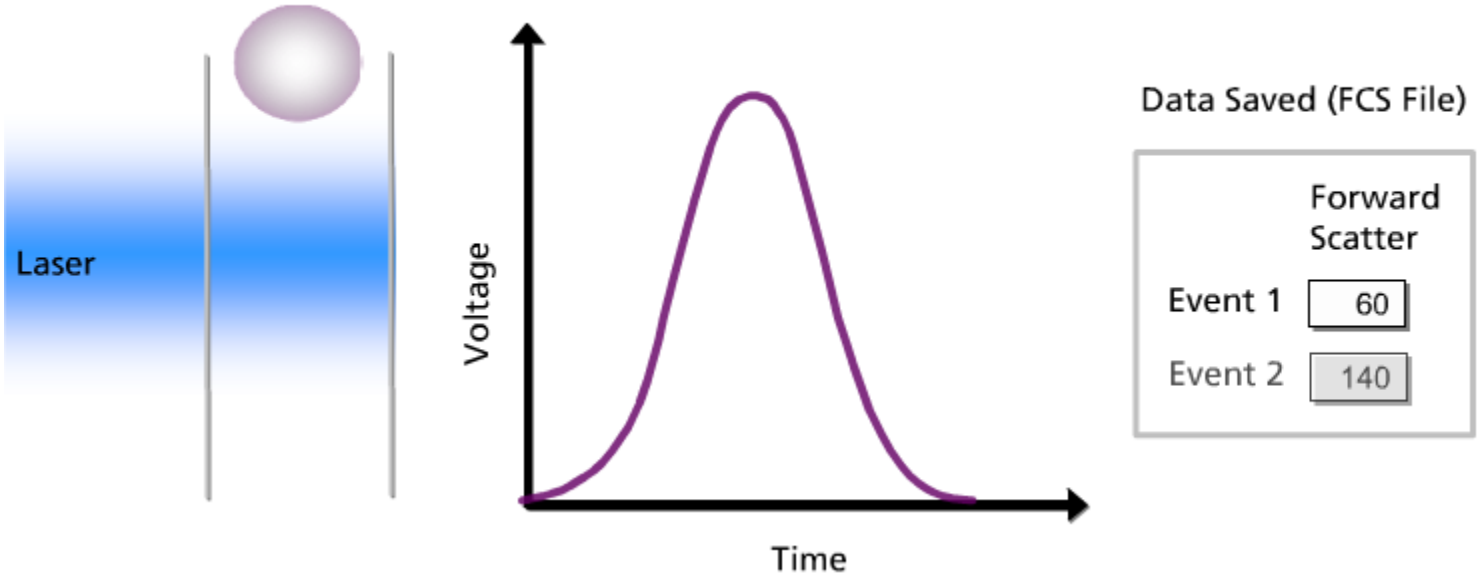


Tipos de señales

Señales de fluorescencia



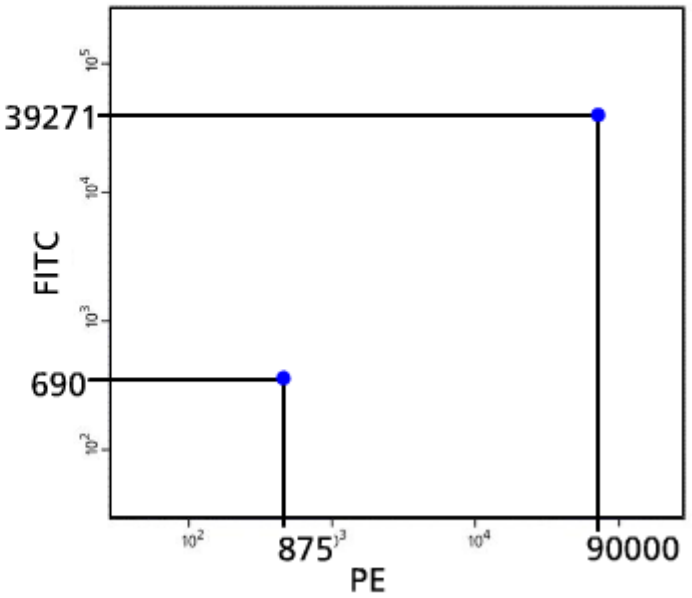
Recolección de datos



Display de datos

Data

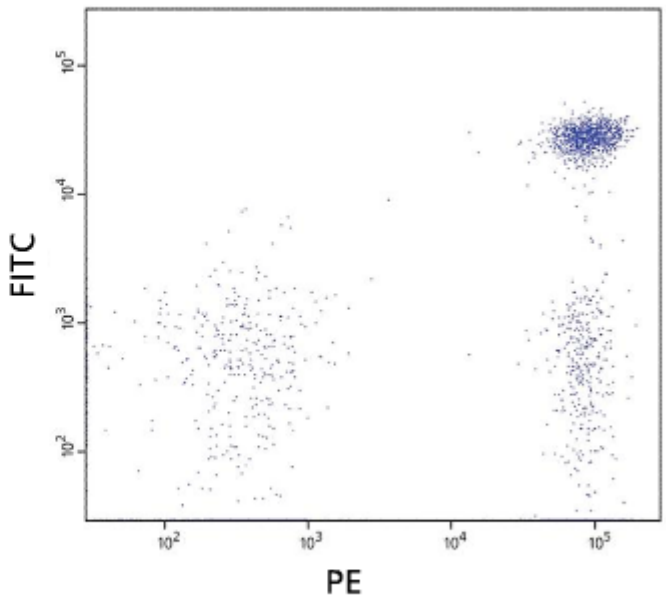
Event	FSC	SSC	FITC	PE
1	60	120	690	875
2	160	65	39271	90000
3	650	160	22688	6189



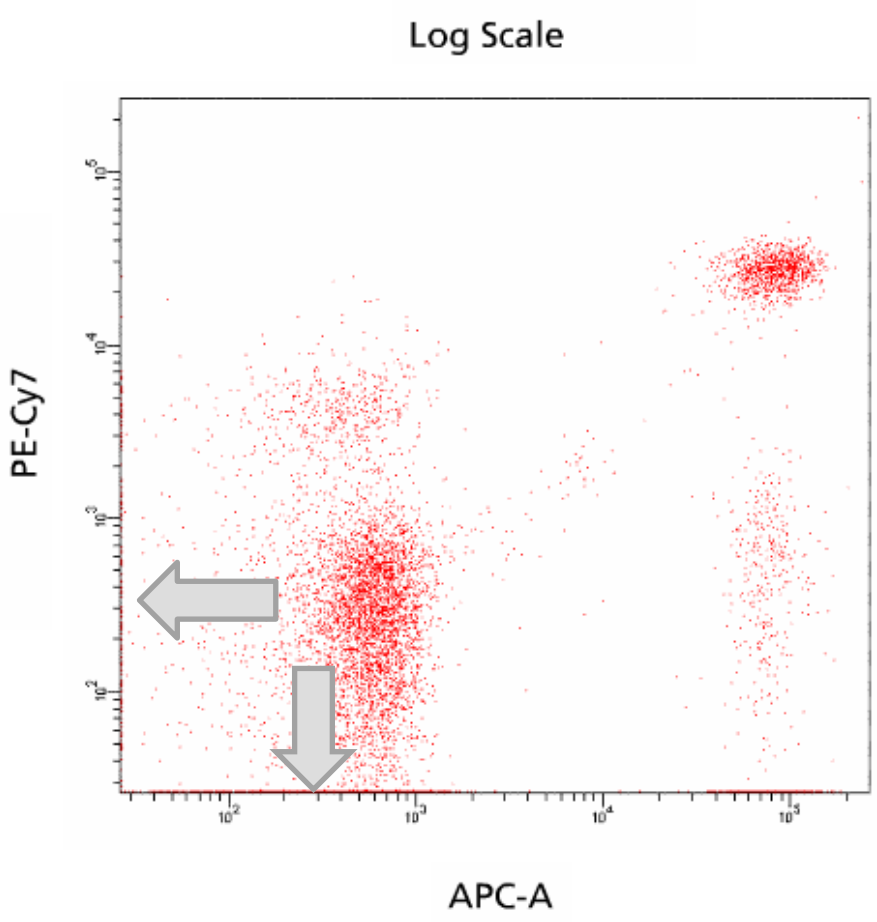
Display de datos

Data

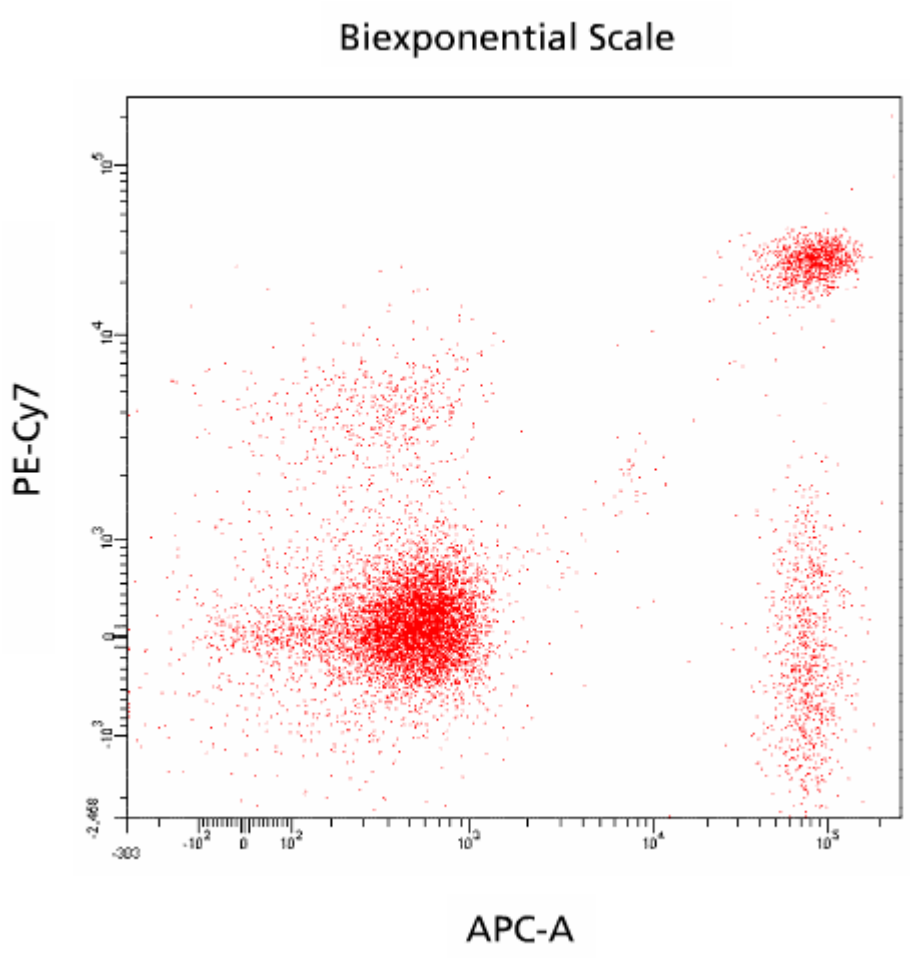
Event	FSC	SSC	FITC	PE
1	60	120	690	875
2	160	65	39271	90000
3	650	160	22688	6189



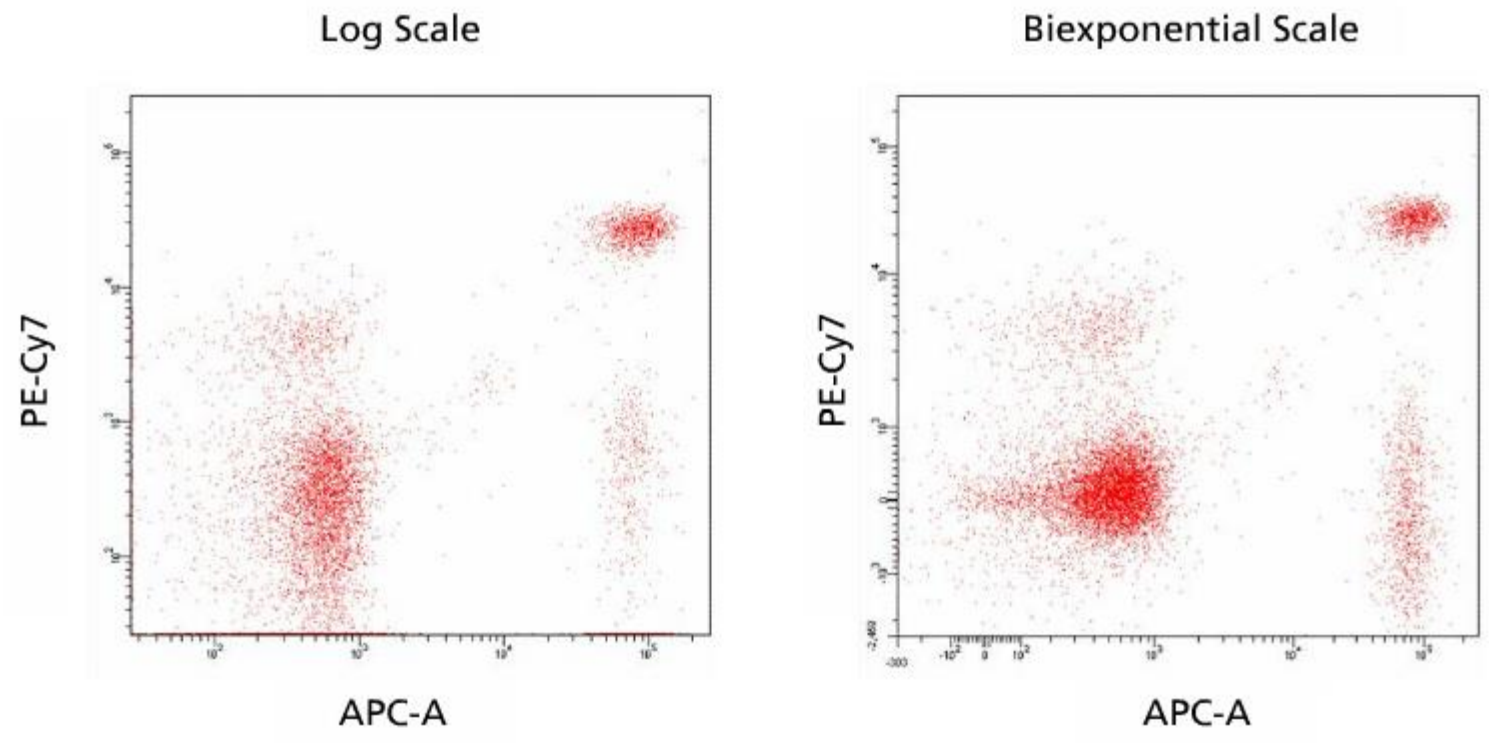
Escala log



Escala biexponencial

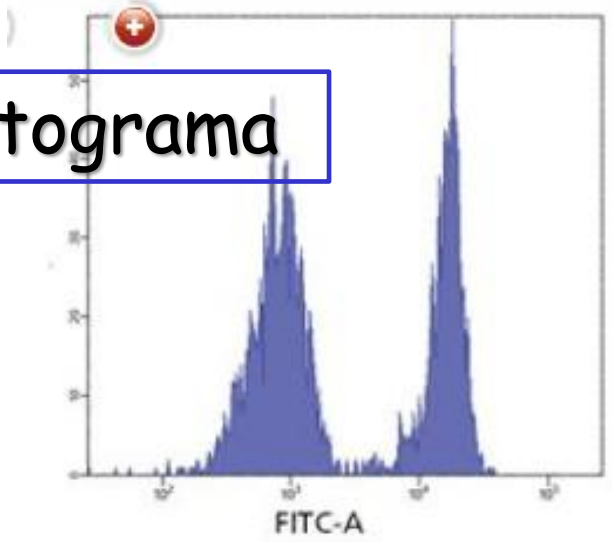


Escalas log y biexponencial

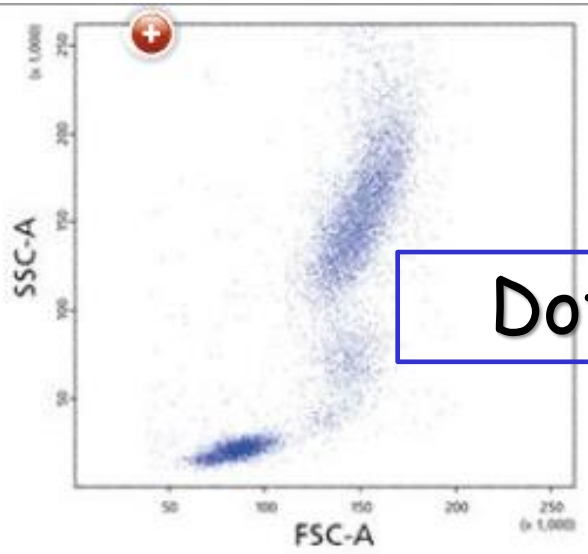


Tipos de gráficos

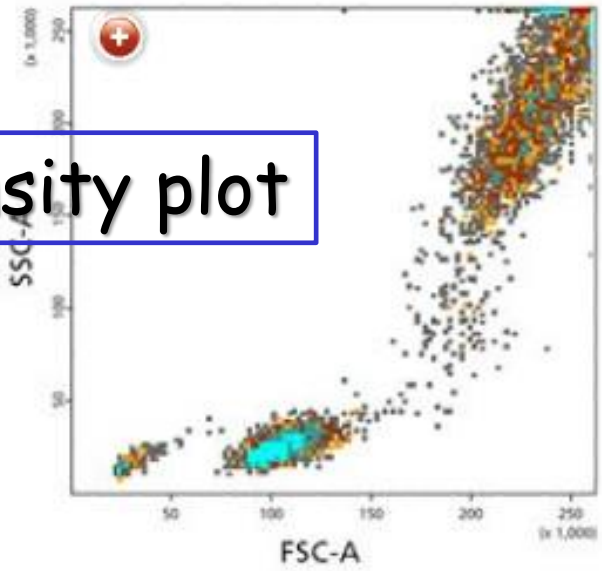
Histograma



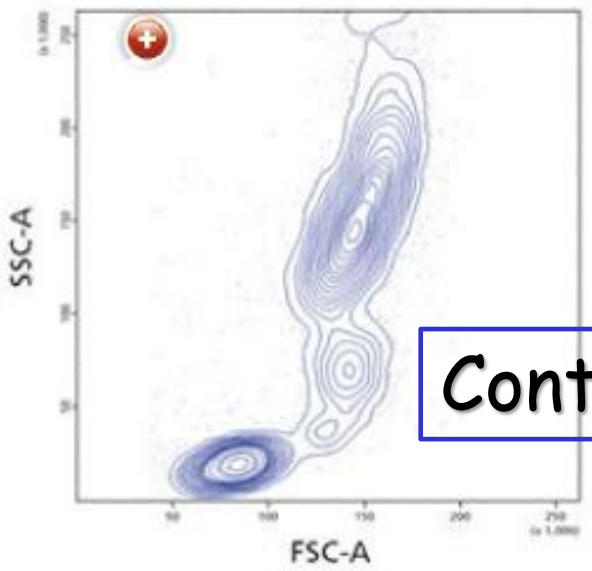
Dot plot



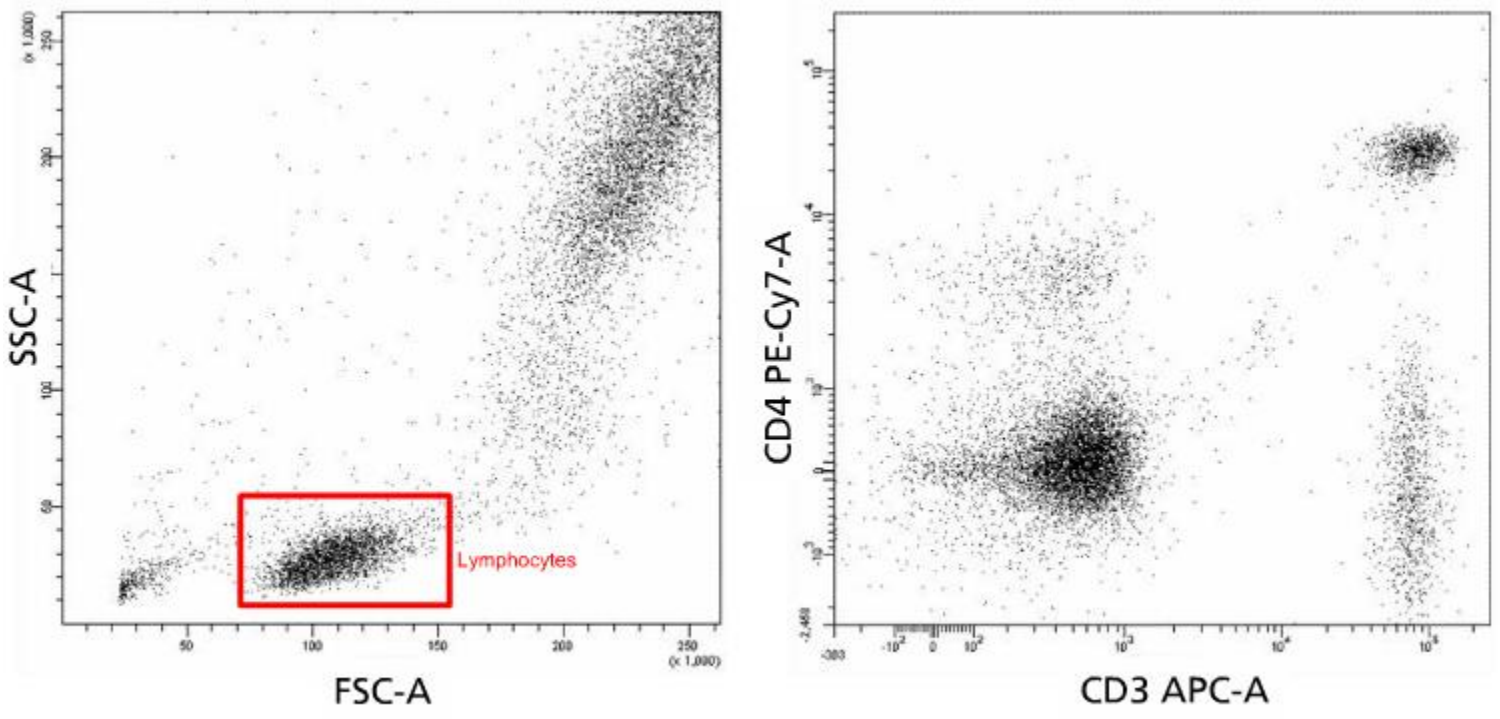
Density plot



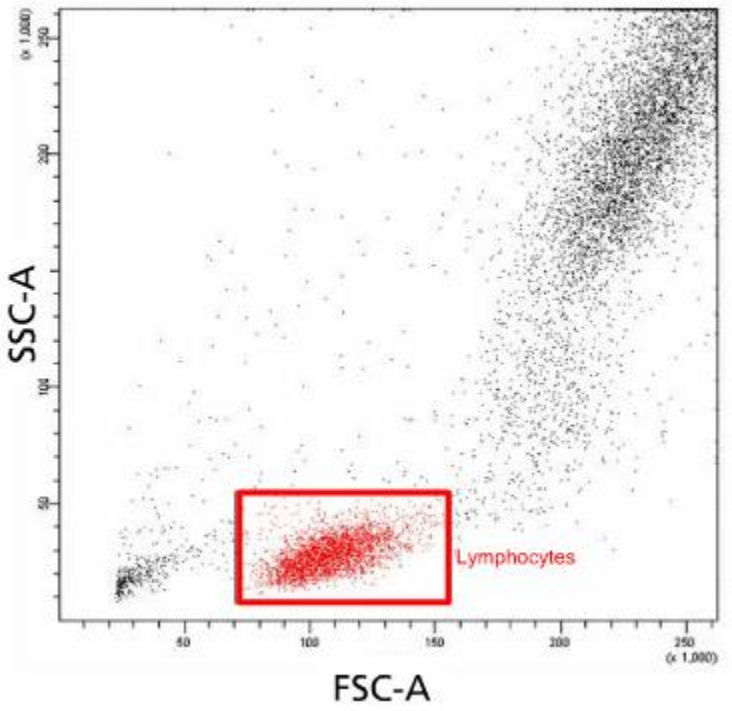
Contour plot

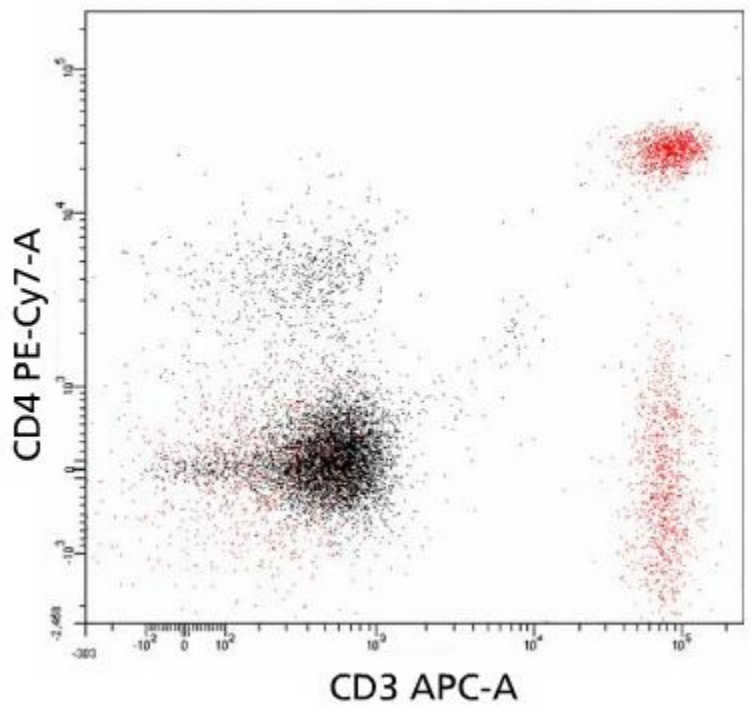


Gate

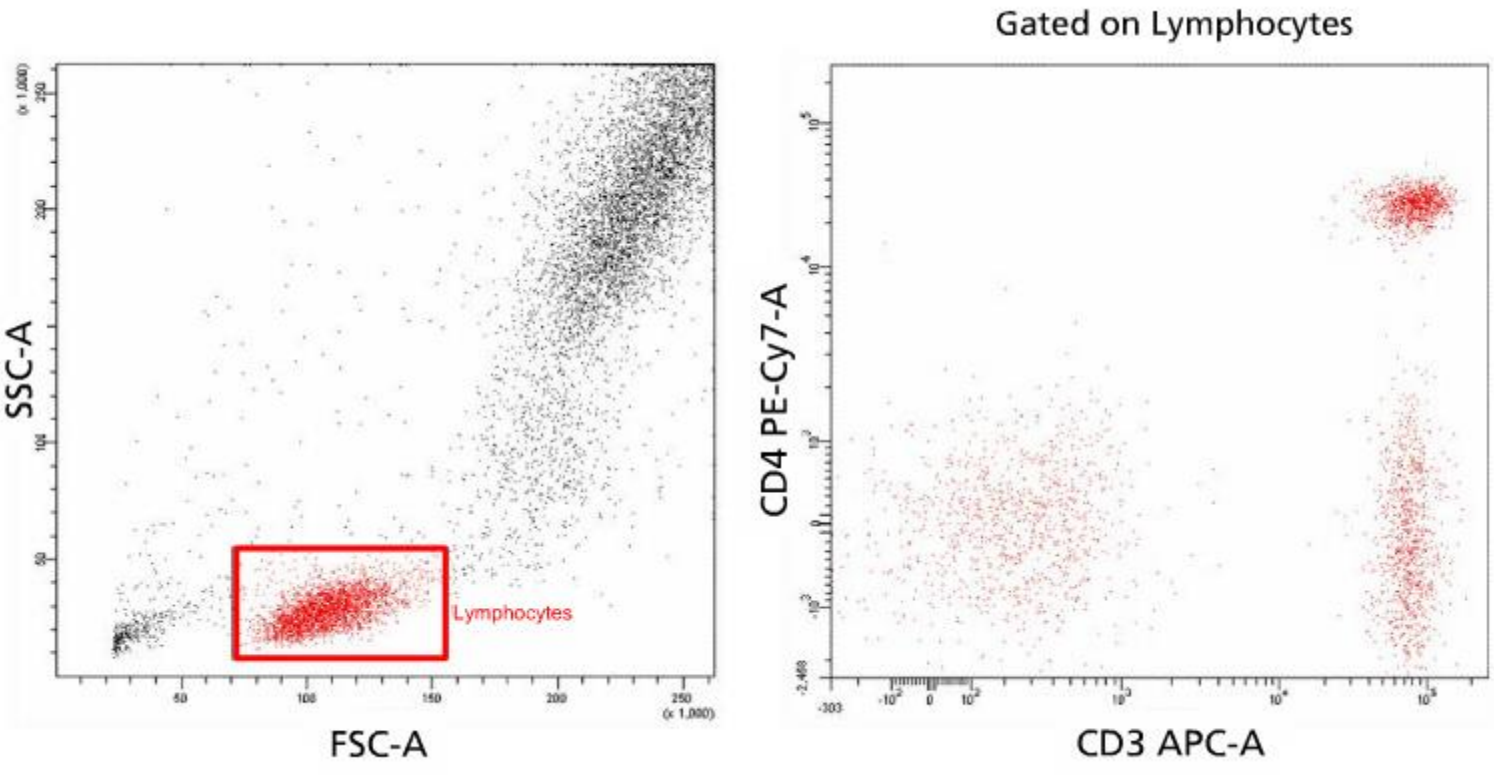


Gate en linfocitos



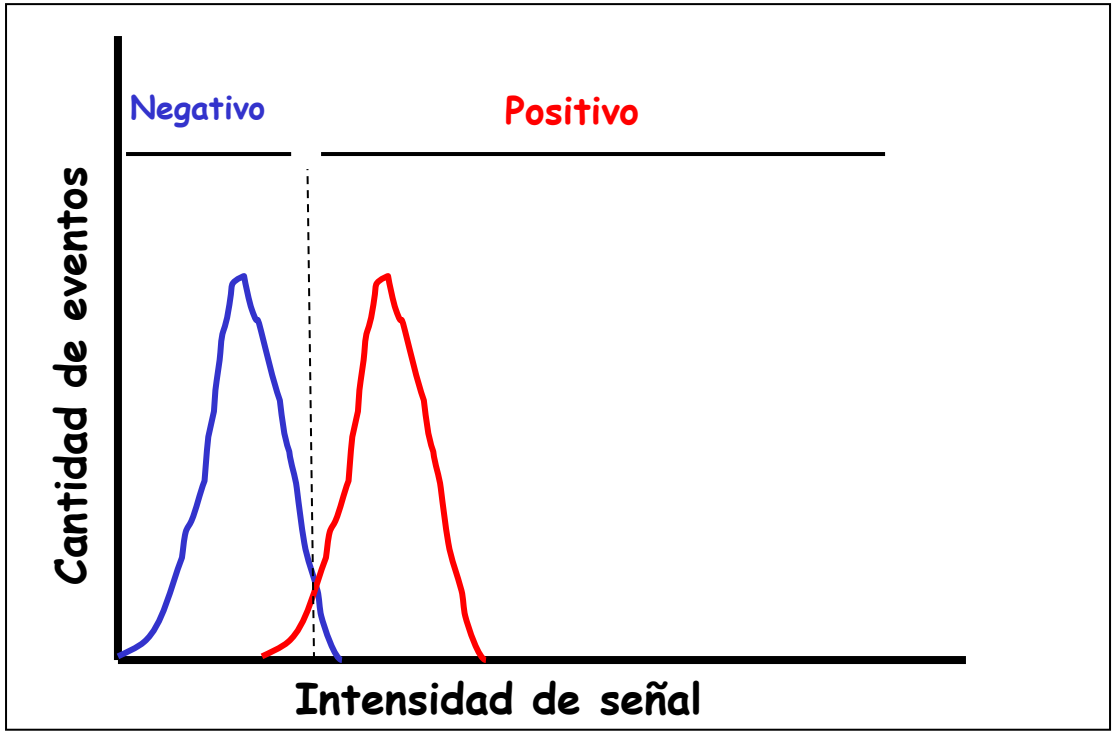


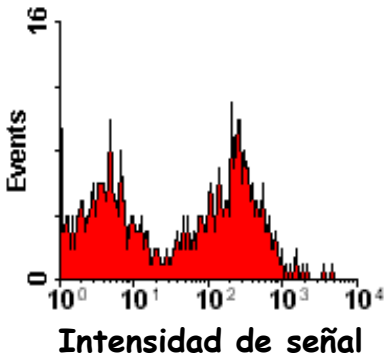
Gate en linfocitos

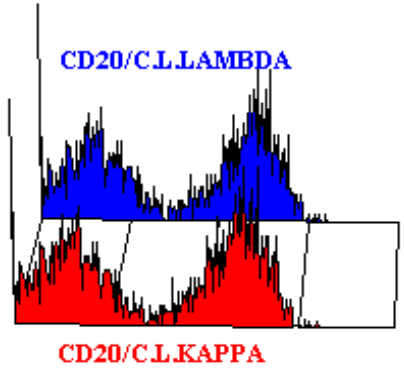


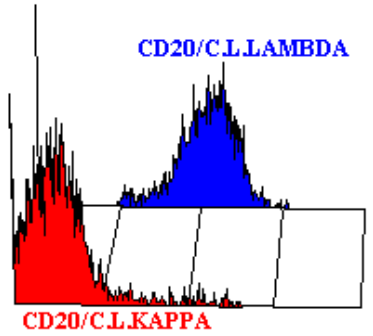
Tipos de gates: Intervalo/ marker

- Histogramas



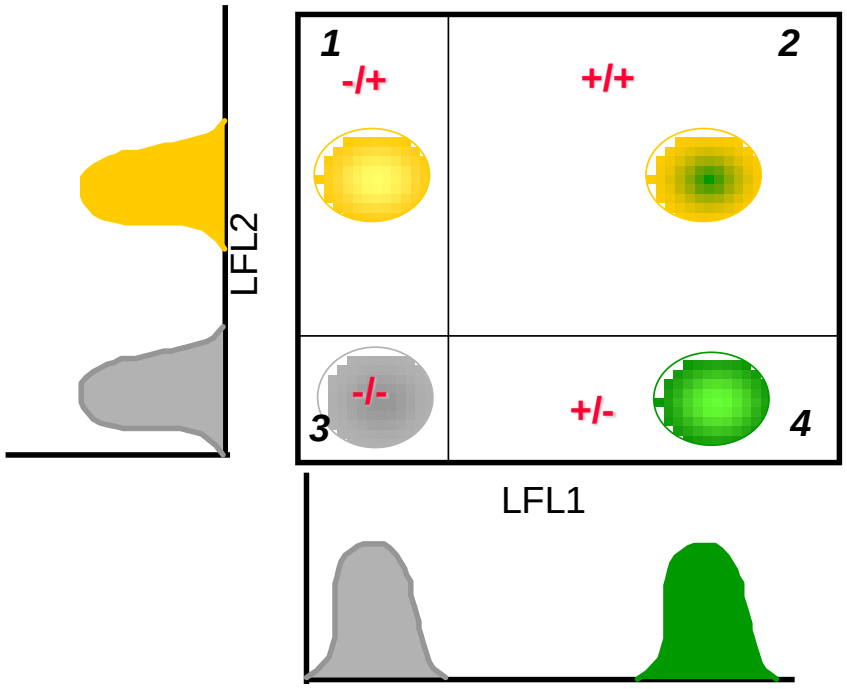


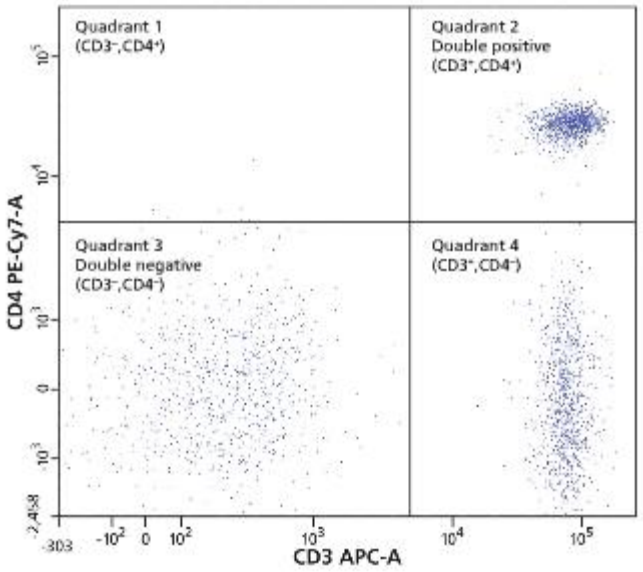




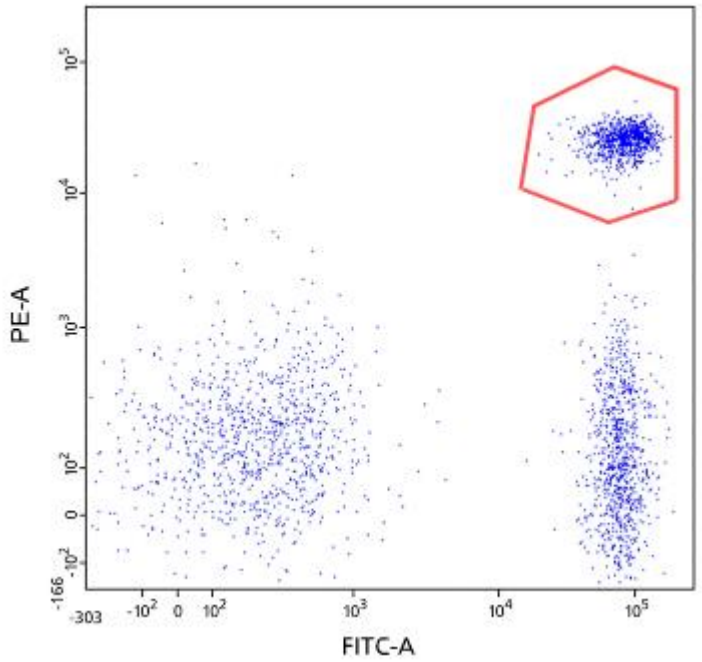
Tipos de gates: Cuadrantes

- Dot plot

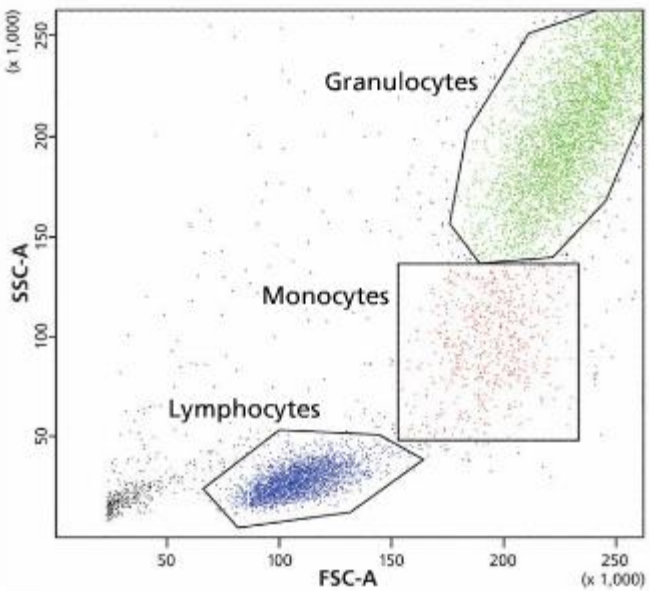


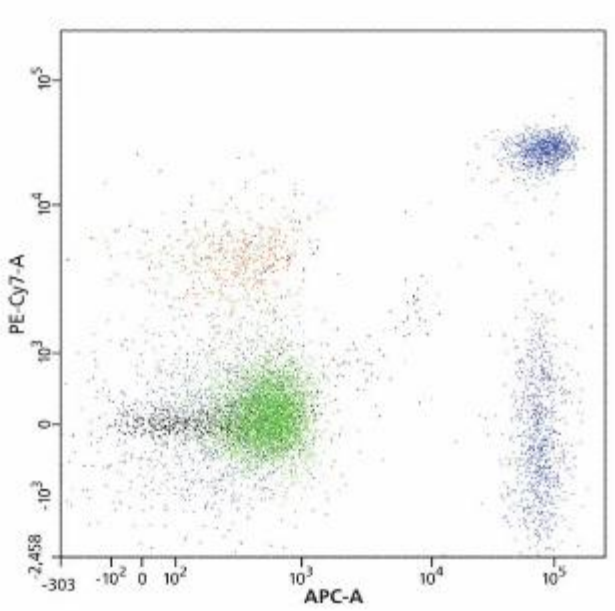


Tipos de gates: Polígonos



Display de eventos en color

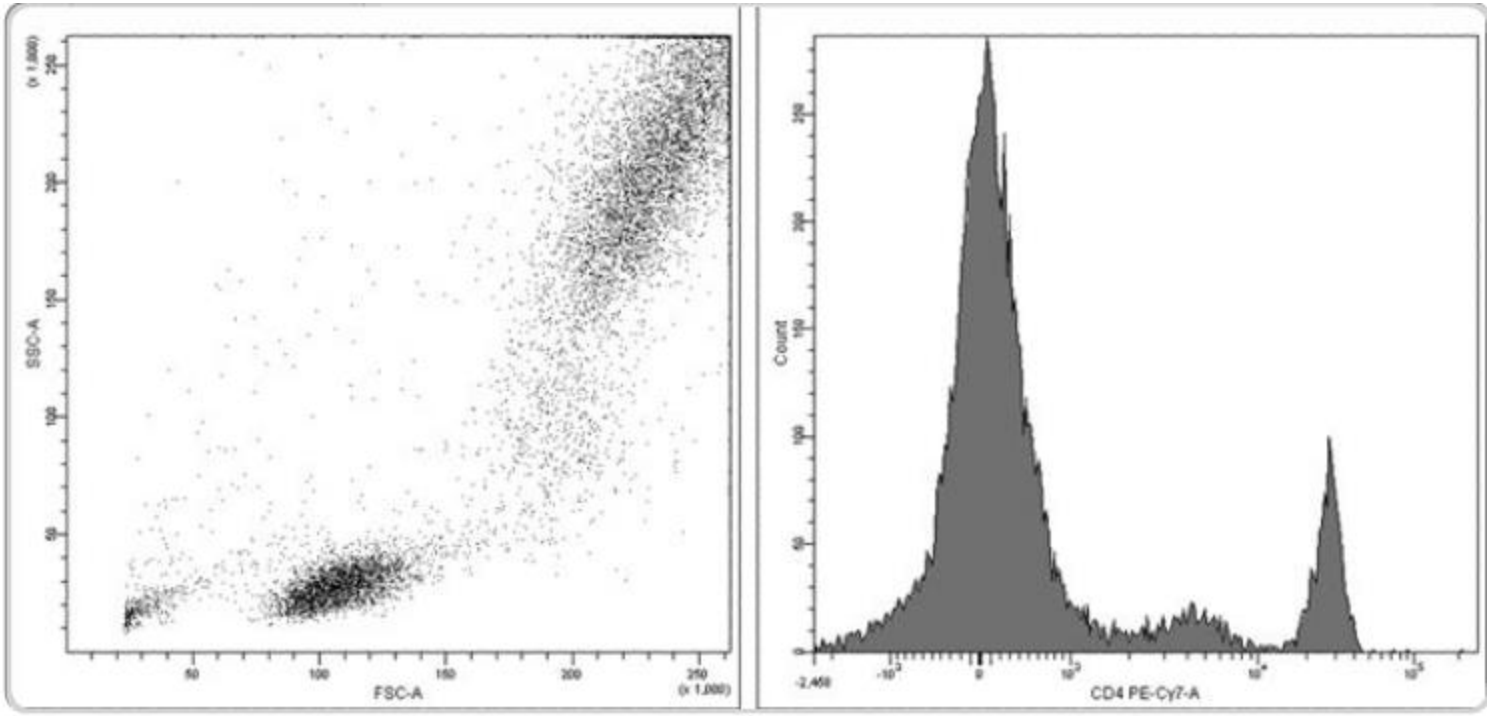




Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
Lymphocytes	2,777	27.8	27.8
Monocytes	577	5.8	5.8
Granulocytes	5,792	57.9	57.9

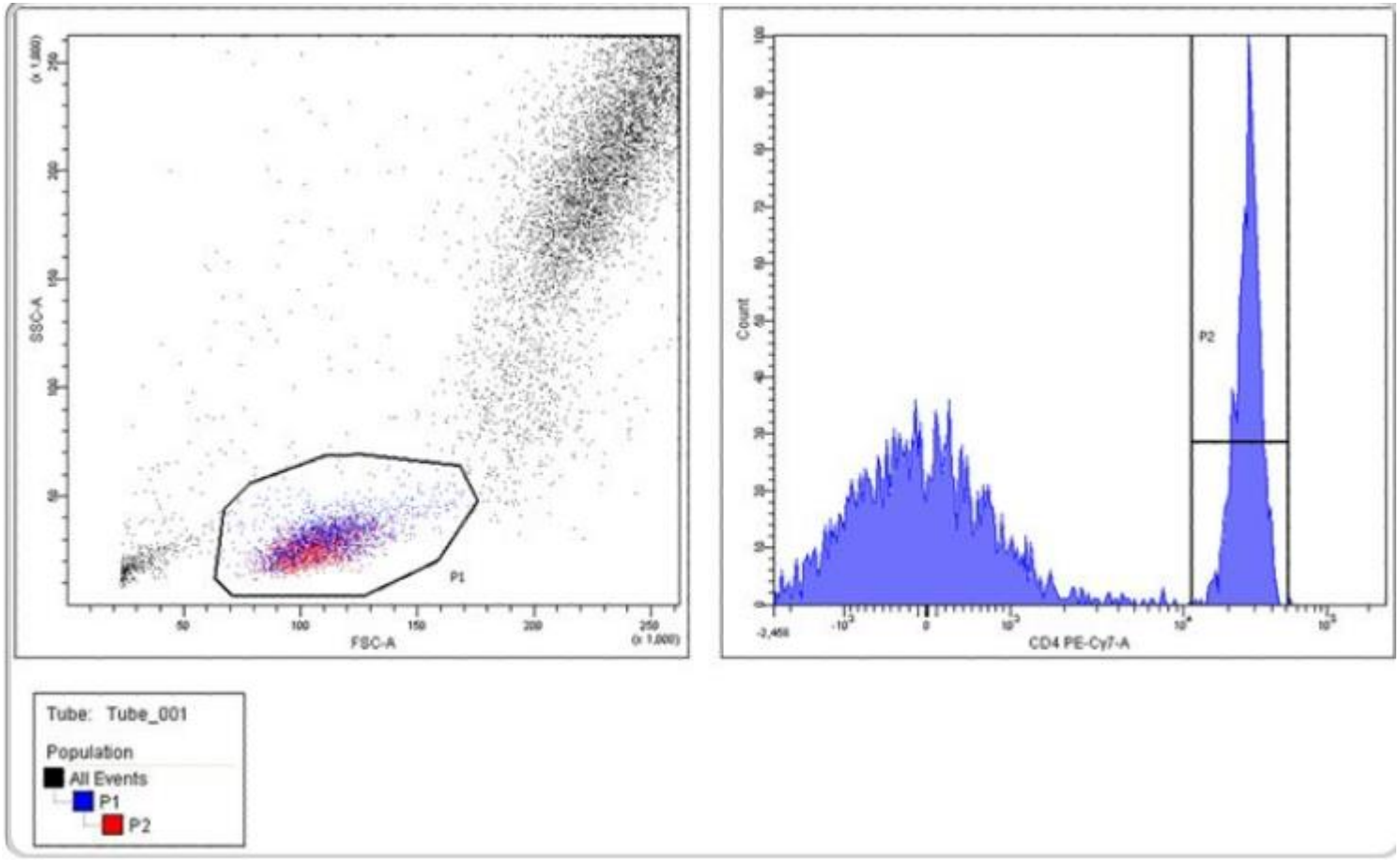
Análisis de datos:

1- Mostrar los datos en distintos gráficos



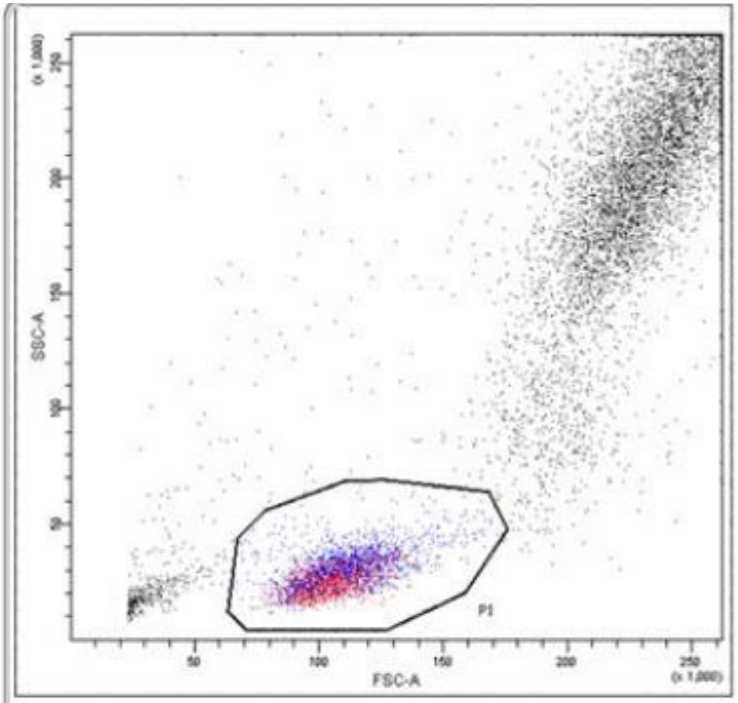
Análisis de datos:

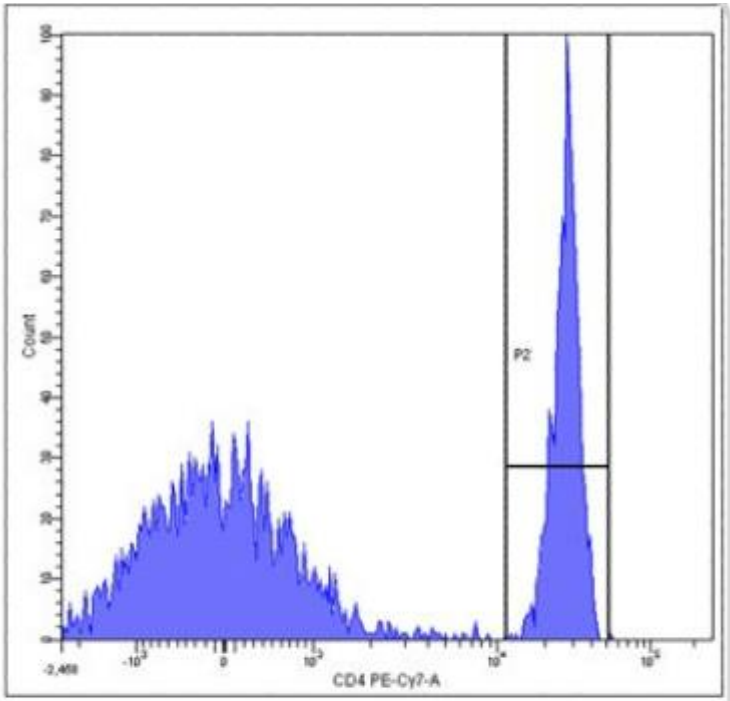
2- Hacer gates para identificar subpoblaciones de interés y asignarle un color



Análisis de datos:

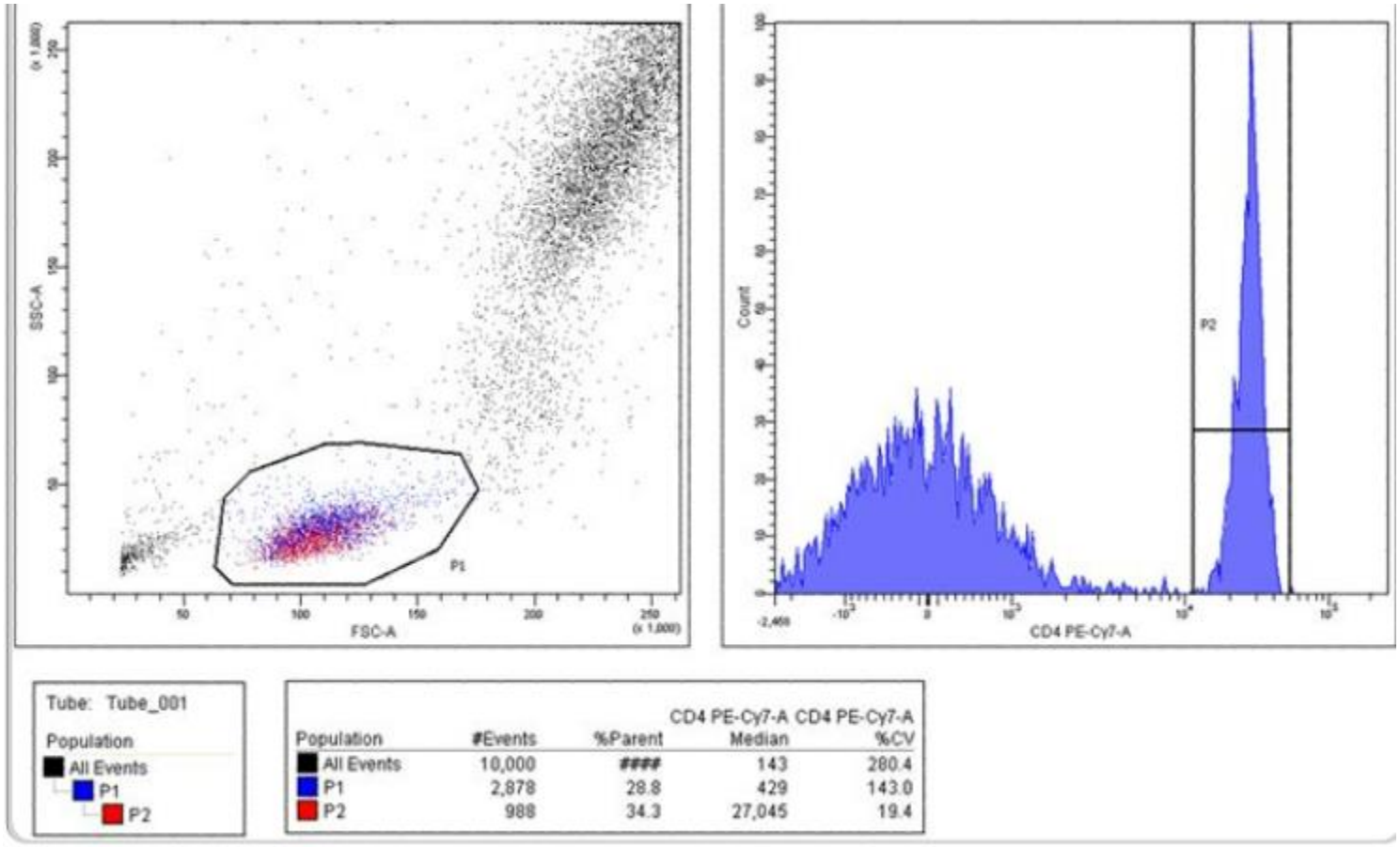
3- Mostrar la estadística para ver la distribución de los eventos





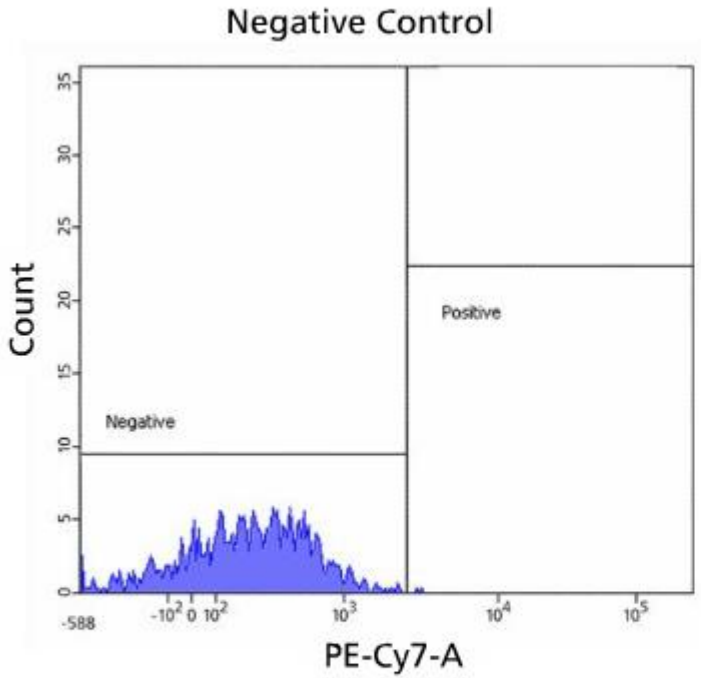
Population	#Events	%Parent	CD4 PE-Cy7-A Median	CD4 PE-Cy7-A %CV
All Events	10,000	####	143	280.4
P1	2,878	28.8	429	143.0
P2	988	34.3	27,045	19.4

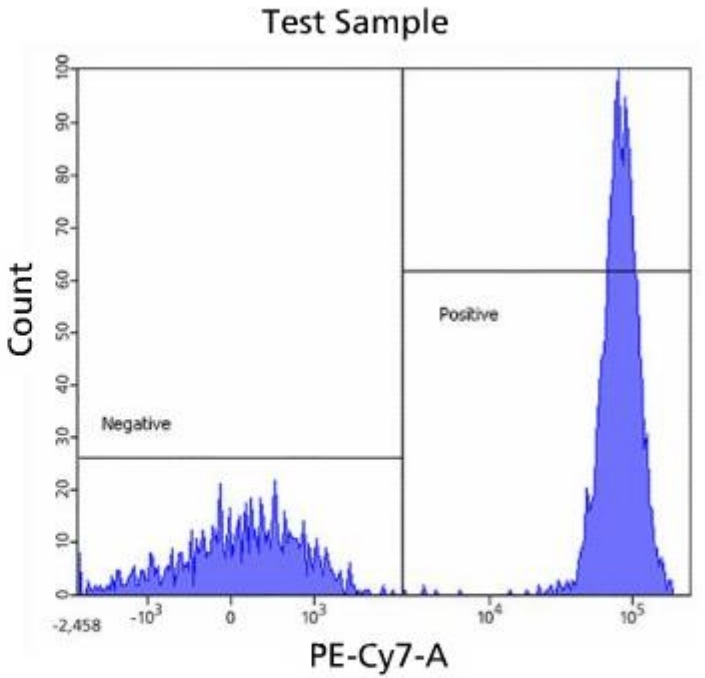
4- Analizar los datos



Population	#Events	%Parent	CD4 PE-Cy7-A Median	CD4 PE-Cy7-A %CV
All Events	10,000	####	143	280.4
P1	2,878	28.8	429	143.0
P2	988	34.3	27,045	19.4

Ejemplo:
% de positividad

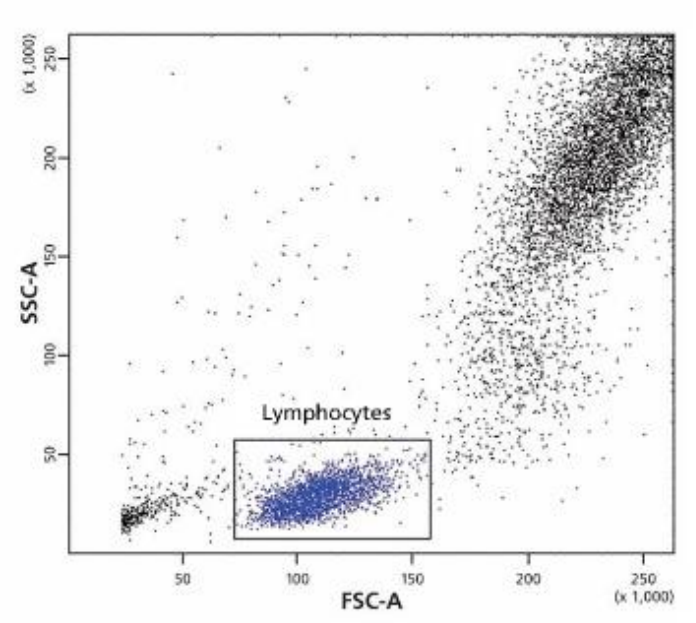


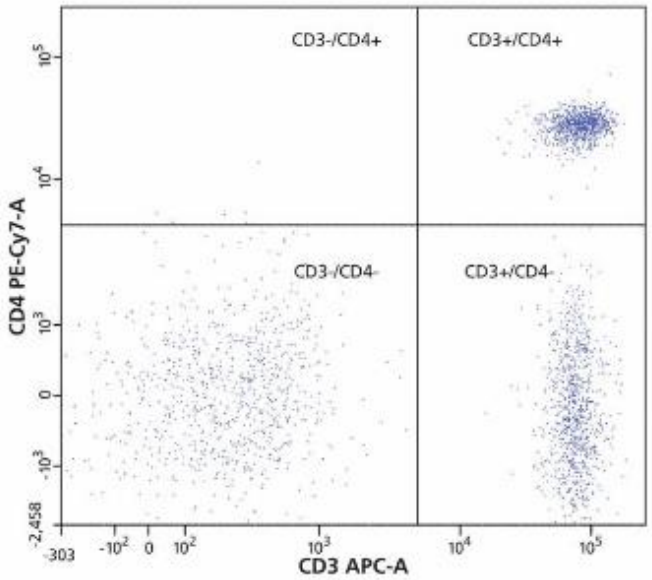


Population	#Events	%Parent
Negative	921	33.3
Positive	1,834	66.7

Ejemplo:

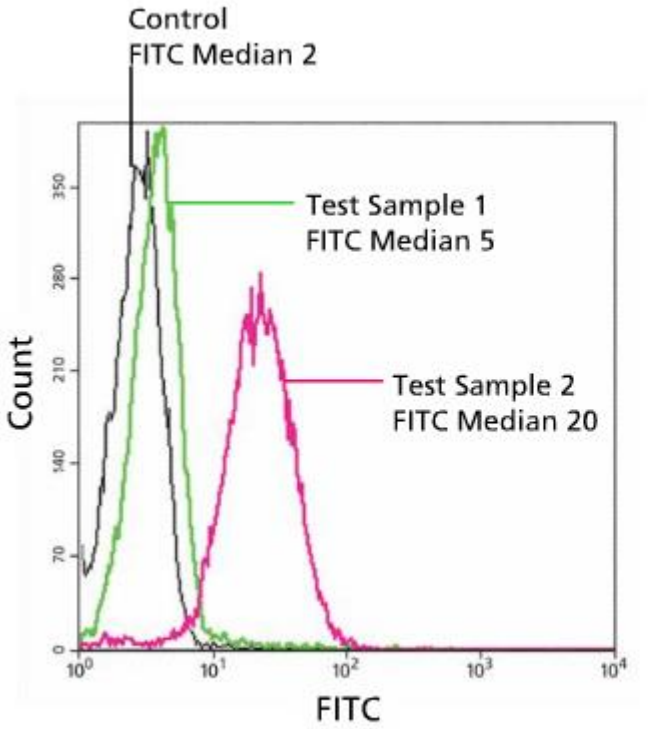
% de positividad usando cuadrantes



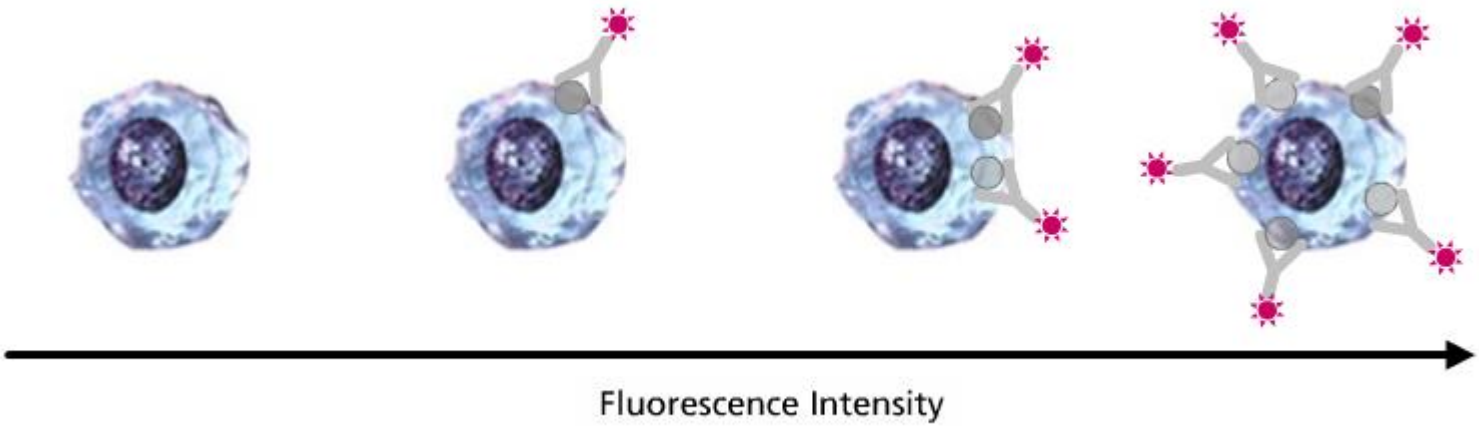


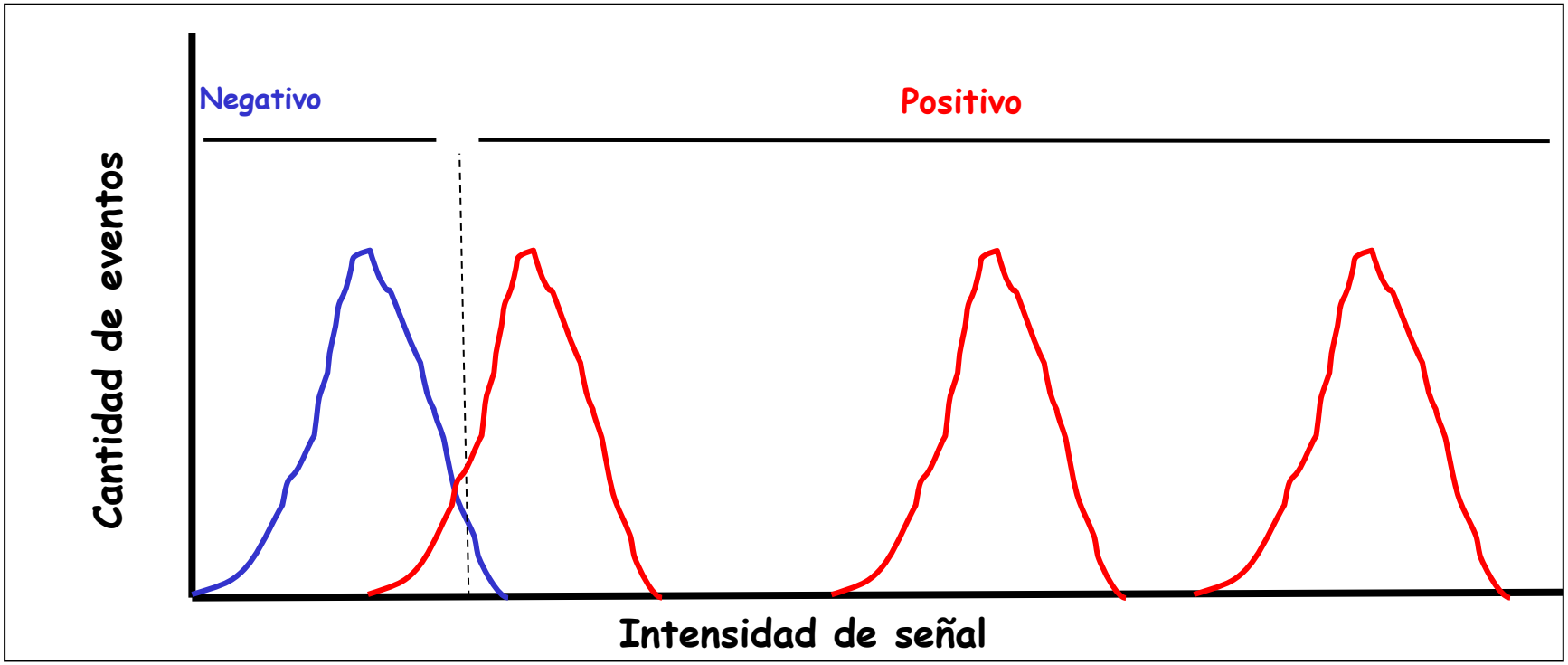
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
Lymphocytes	2,714	27.1	27.1
CD3-/CD4+	252	9.3	2.5
CD3+/CD4+	1,067	39.3	10.7
CD3-/CD4-	851	31.4	8.5
CD3+/CD4-	544	20.0	5.4

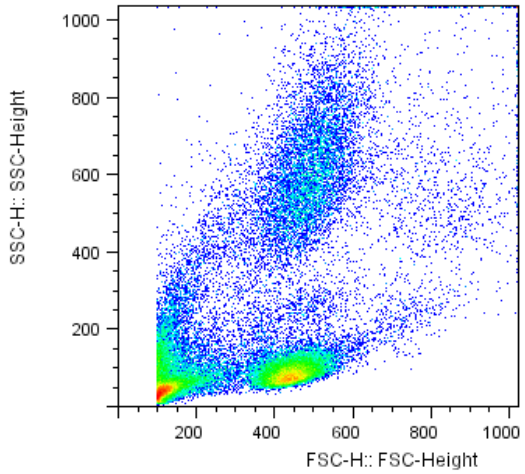
Ejemplo:
Grado de positividad



Legend	Name	FITC Median
	Control	2
	Test sample 1	5
	Test sample 2	20

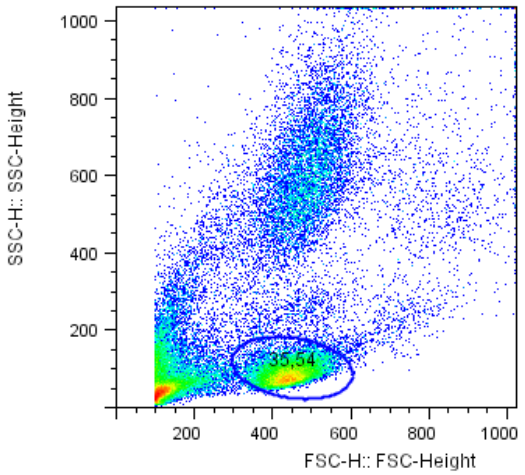

Fluorescence Intensity


Negativo
Positivo
Cantidad de eventos
Intensidad de señal

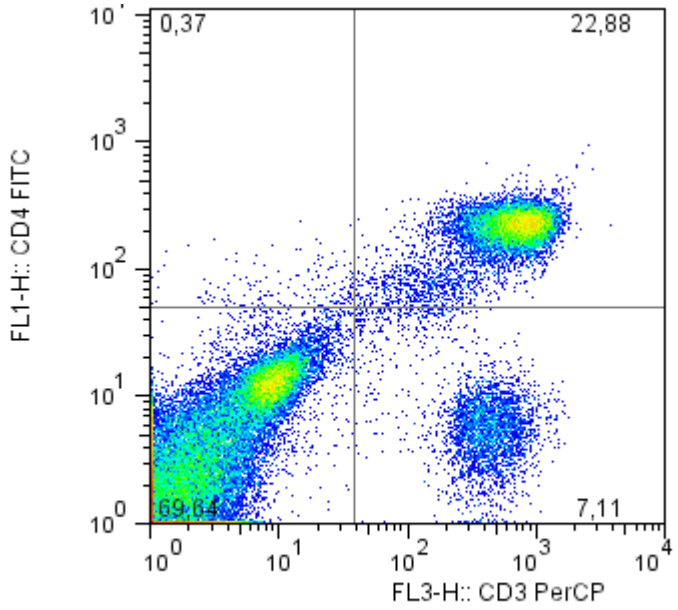


Elijo un gate

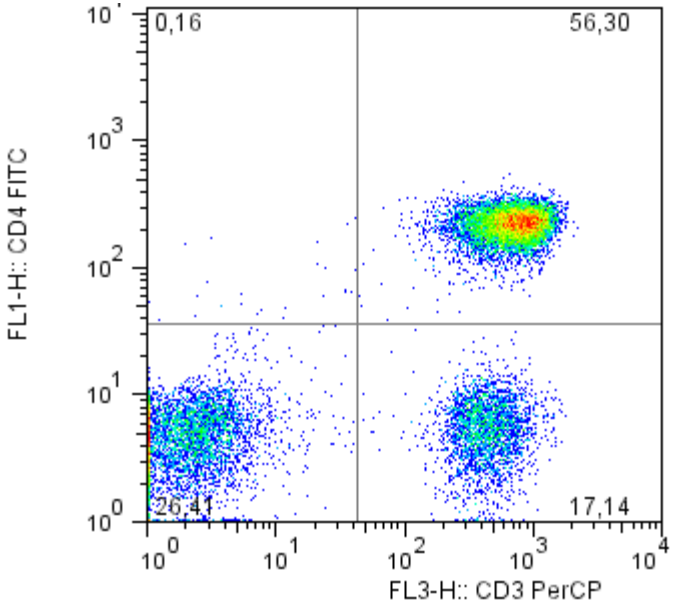
Linfocitos



CD3- CD4 en sangre total



CD3 – CD4 en gate de linfocitos

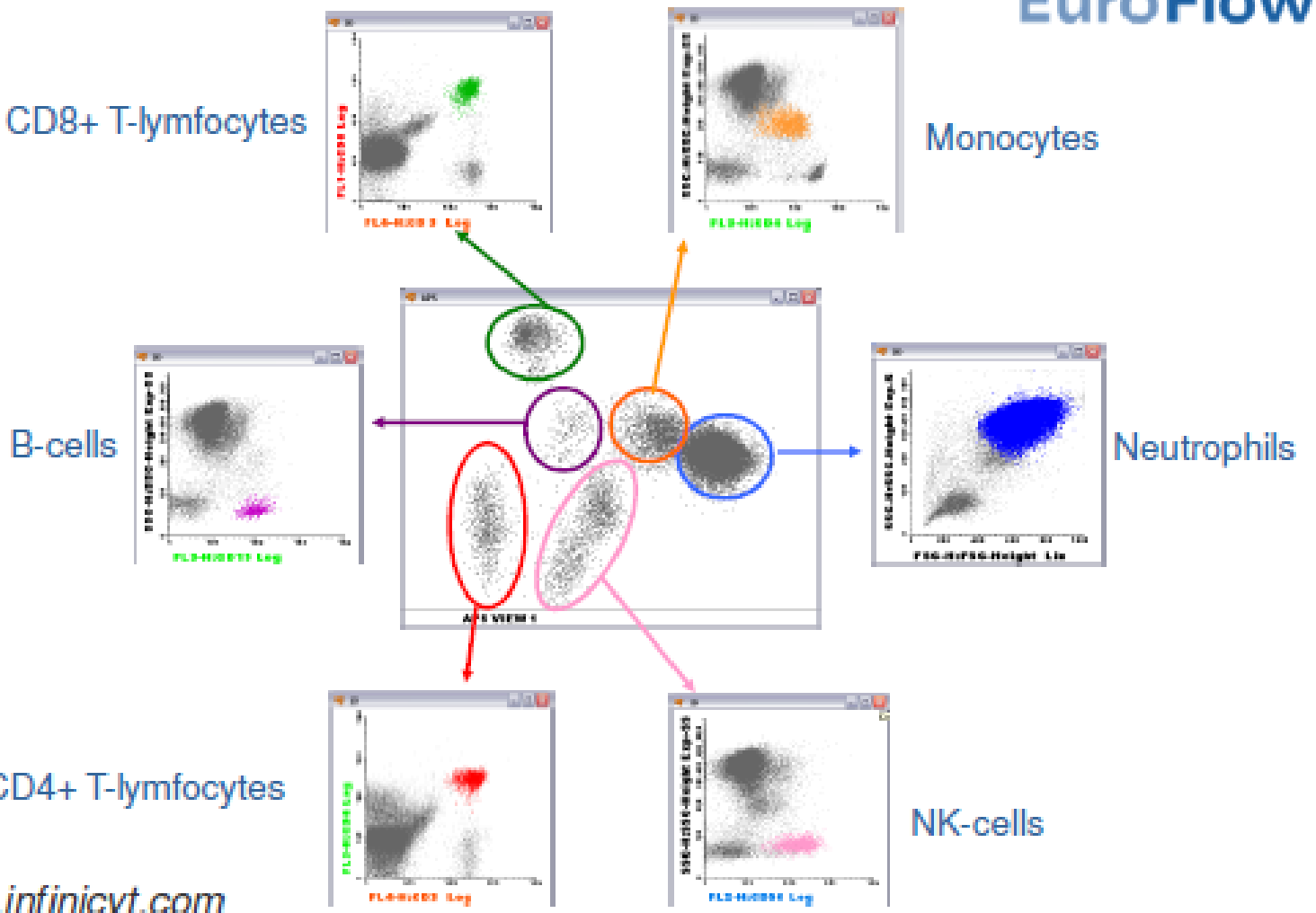


Software de Análisis de Datos para Citometría de Flujo

APS (Separador automático de Poblaciones)

Automated population separation (APS)

EuroFlow



www.infinicyt.com

Muchas gracias

Bioq. Andrea Novoa

andreanovoa74@hotmail.com